



INSTITUTO EVANDRO CHAGAS
NÚCLEO DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIROLOGIA

ANA ALICE DE AQUINO

**ESTUDO DA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE
CORDÃO UMBILICAL HUMANO (LINHAGEM EA.hy926) DURANTE A
INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO VÍRUS ZIKA**

Ananindeua

2019

ANA ALICE DE AQUINO

**ESTUDO DA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE
CORDÃO UMBILICAL HUMANO (LINHAGEM EA.hy926) DURANTE A
INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO VÍRUS ZIKA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Virologia do Instituto Evandro Chagas para a obtenção do título de Mestre em Virologia.

Área de concentração: Fisiopatologia humana e experimental causada por agentes virais

Orientador: Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

Ananindeua

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto Evandro Chagas

Aquino, Ana Alice de.

Estudo da ativação do inflamassoma em células endoteliais de cordão umbilical humano (linhagem EA.hy926) durante a infecção experimental pelo vírus Zika. / Ana Alice de Aquino. – Ananindeua, 2019.

55 f.: il.; 30 cm

Orientador: Dr Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

Dissertação (Mestrado em Virologia) – Instituto Evandro Chagas, Programa de Pós-Graduação em Virologia, 2019.

1. Vírus Zika. 2. Inflamassoma. 3. Células endoteliais. 4. Caspase-1. I. Vasconcelos, Pedro Fernando da Costa, *orient.* II. Instituto Evandro Chagas. III. Título.

CDD: 616.9185

ANA ALICE DE AQUINO

**ESTUDO DA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DE
CORDÃO UMBILICAL HUMANO (LINHAGEM EA.hy926) DURANTE A
INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO VÍRUS ZIKA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação
em Virologia do Instituto Evandro Chagas para a
obtenção do título de Mestre em Virologia

Área de concentração: Fisiopatologia humana e
experimental causada por agentes virais

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz
Instituto Evandro Chagas

Dra. Flávia Barreto dos Santos
Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma
Instituto Evandro Chagas

Dra. Milene Silveira Ferreira
Instituto Evandro Chagas (Suplente)

*Aos meus pais, Luiz Gonzaga e Maria Alice,
com todo o amor, carinho e gratidão que há em meu coração.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial os meus pais, por todo amor, cuidado e incentivo. Agradeço e reconheço todos os sacrifícios para tornar a educação prioridade número um em minha vida. Obrigada, ainda, por permitirem e apoiarem a realização de tudo o que me proponho a fazer, dando suporte a cada um dos meus passos.

Ao meu orientador, Dr. Pedro Vasconcelos, primeiramente por ter me aceito como sua aluna através de uma ligação e por ter aberto as portas do Instituto Evandro Chagas (IEC) e da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) para mim. Agradeço por sempre ter me recebido e me escutado com tanto carinho e atenção. Agradeço também pela confiança e comprometimento comigo e com o nosso trabalho.

À Dra. Daniele Medeiros, ao MSc. Bruno Nunes e à MSc. Jannyce Guedes, o meu mais sincero e genuíno obrigada! Espero através dos nossos trabalhos juntos e da nossa amizade retribuir à altura o suporte incondicional (científico e emocional) que vocês me proporcionaram. É certo que falharei em cada tentativa de agradecer o suficiente. Ainda assim: muito obrigada!

Ao IEC, à SAARB e ao programa de pós-graduação em Virologia pela oportunidade de ingresso e por todo o suporte humano, financeiro e estrutural destinados à esta dissertação e a mim ao longo dos três anos em que estou aqui. Desenvolver o meu trabalho e outras pesquisas e obter o título de Mestre em Virologia nesta instituição é certamente uma de minhas maiores conquistas pessoal e profissional.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e de Cultura de Células da SAARB pelo inestimável suporte, troca de experiências e doações de células e insumos.

Aos membros das bancas examinadoras, na Qualificação e Defesa, pela disponibilidade e contribuições apresentadas. Cada um foi oportunamente escolhido para enriquecer este trabalho!

À Dra. Ana Cecília pelo carinho maternal, abrigo e conforto desde a primeira vez em que cheguei no IEC. Obrigada pelo acolhimento em que fui recebida todas as vezes em sua sala e em seu coração.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular: Ana Cecília, Daniele Medeiros, Bruno, Alice, Dani, Alê, Sandro, Ivy e Glenda. Eterna gratidão pela nossa amizade e convivência, por vocês me ensinarem e me educarem tanto, todos os dias! Eu gosto de cada um especialmente!

Um agradecimento especial a minha querida prima Tatiana Aquino por dividir comigo as bonanças e angústias em todas as esferas da vida. Aos colegas da pós-graduação, em especial o “grupo fixo trabalhos ppgv”, por compartilharmos tantas disciplinas e momentos durante esta fase. E, de maneira simbólica, aos amigos de toda a vida por serem verdadeiros facilitadores da minha jornada.

Por fim, a todos que colaboraram direta e indiretamente com a minha formação e com a realização deste trabalho de dissertação, o meu muito obrigada!

Regozijai-vos sempre, orai sem cessar e em tudo dai graças.

(I Tessalonicenses 5:16-18)

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. A zika é uma doença febril aguda caracterizada por febre, erupção cutânea maculopapular, artralgia e edema de membros. Em 2015, quando chegou ao Brasil, o ZIKV causou a sua maior epidemia e surpreendeu pela habilidade de causar danos ao sistema nervoso central, incluindo um elevado número de casos de microcefalia no Nordeste do país. A patogenia induzida pelo ZIKV ainda não está esclarecida, bem como a sua interação com as células que compõem a interface materno-fetal. A resposta imune inata exerce importante função na determinação do curso da infecção viral e tem início com o reconhecimento de padrões virais e/ou danos celulares por receptores de reconhecimento de padrões resultando em resposta antiviral e inflamatória. A ativação do inflamassoma vem ganhando reconhecimento como um importante mecanismo de proteção diante das infecções virais. Assim, o presente estudo avaliou se o ZIKV é capaz de induzir a ativação do inflamassoma em cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano (linhagem EA.hy926) através da detecção dos níveis de caspase-1. Células EA.hy926 foram infectadas utilizando dois isolados do ZIKV (BeH818305 e BeH815744) (MOI 0,01) e as análises foram realizadas nos períodos de 24, 36 e 48 horas pós-infecção. Como resultados observou-se considerável efeito citopático celular em 48 horas pós-infecção, aumento nos níveis de ativação de caspase-1 também em 48 horas pós-infecção pelo isolado viral BeH818305 e diminuição da viabilidade celular para ambos os vírus de forma tempo-dependente de infecção. Estudos adicionais são necessários para identificação dos receptores envolvidos e caracterização do perfil imunológico de resposta.

Palavras-chave: Vírus Zika; inflamassoma; células endoteliais; caspase-1.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus of the family Flaviviridae, genus Flavivirus. The clinical presentation of zika are fever, maculopapular rash, arthralgia and edema. In 2015 the emergence of ZIKV in Brazil resulted in the largest epidemic with neurological damages in the country, increasing microcephaly cases in Northeast region. The pathogeny of ZIKV is not clear yet, especially the relationship with cells at the maternal-fetal interface. The innate immune system play an important role in determining the natural history of viral infections after recognition of viral patterns and/or cell damps by pattern recognition receptor result in antiviral and inflammatory responses. Inflammasome activation is gaining recognition as an importante protection mechanism during viral infection. In the presente study, we determined whether ZIKV infection causes inflammasome activation on umbilical vein-derived endothelial cells (lineage EA.hy926) by detection on activation levels of caspase-1. EA.hy926 cells were infected using two isolates of ZIKV (BeH818305 and BeH815744) (MOI 0,01) and the analyses were perfomed in the periods of 24, 36 e 48 hours pos-infection. Our results reveled a cytopathic effect at 48 hours pos-infection, increase in caspase-1 levels also at 48 hours pos-infection by viral isolate BeH818305 e decrease of cell viability for both isolates by time-dependent infection. Adicional studies are needed to identify the receptors and to characterize the immune response profile.

Key words: Zika virus; inflammasome; endothelial cells; caspase-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura viral (A e B) e organização do genoma dos flavivírus e seus produtos traducionais (C)	13
Figura 2 - Representação esquemática das estruturas básicas para a formação do inflamassoma com os seus produtos de maturação proteolítica	23
Figura 3 – Curva de crescimento do ZIKV na doença neurológica (BeH818305) e autolimitada (BeH815744) em cultura de células Vero.....	31
Figura 4 – Cultura de células EA.hy926 infectadas com ZIKV nos períodos de 24 e 48 horas pós-infecção	33
Figura 5 – Nível de ativação de caspase-1 frente a infecção pelo ZIKV nos períodos de 24 (A), 36 (B) e 48 (C) horas pós infecção em cultura de células EA.hy926	34
Figura 6 – Viabilidade celular em cultura de células EA.hy926 frente a infecção pelos ZIKV nos períodos de 24 (A), 36 (B) e 48 (C) horas pós infecção	35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AIM-2 - Receptor de reconhecimento padrão da família ALR (*absent in melanoma 2*)
- ALR - Família de receptor de reconhecimento padrão semelhante ao AIM2 (*AIM2-like receptor*)
- ASC - Proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD
- BIR - Proteína repetida inibidora da apoptose em baculovírus
- C - Proteína do Capsídeo
- CARD - Domínio de recrutamento e ativação de caspases
- CD - Marcador de diferenciação celular
- CHIKV - Vírus Chikungunya (*Chikungunya virus*)
- Cm - Centímetros
- CO₂ - Gás carbônico
- Ct - *Cycle threshold*
- CTLR - Receptor de reconhecimento padrão de lecitina do tipo C
- DAMP - Padrões moleculares associados a danos
- CMV - Citomegalovírus (*Cytomegalovirus*)
- DC-SIGN - Receptor de lectina tipo C (molécula de adesão intercelular específica de célula dendrítica)
- DENV - Vírus Dengue (*Dengue virus*)
- DMAM - Meio de cultura Dulbecco Mem
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- E - Proteína do Envelope
- EA.hy926 - Linhagem celular derivada de veia umbilical humana
- EBV - Vírus Epstein-barr (*Human gammaherpesvirus 4*)
- Fc - Região do fragmento cristalizável da imunoglobulina
- HCV - Vírus da hepatite C (*Hepacivirus C*)
- HBV - Vírus da hepatite B (*Hepatovirus B*)
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus*)
- HHV-5 - Herpesvírus humano 5 (*Human betaherpesvirus 5*)
- HPV - Papilomavírus humano (*Gammapapillomavirus*)
- IFN - Interferon
- IL - Interleucina

IRF - Fator regulador de interferon

JEG-3 - Linhagem celular epitelial derivada de placenta humana

JEV - Vírus da encefalite japonesa (*Japanese encephalitis virus*)

kDa - Kilodaltons

KSHV - Herpesvírus humano associado ao Sarcoma de Kaposi (*Human gammaherpesvirus 8*)

L-SIGN - Receptor de lectina tipo C (molécula de adesão intercelular específica de fígado e linfonodo)

M - Proteína de Membrana

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MOI - Multiplicidade de infecção

mRNA -: Ácido ribonucleico mensageiro

NACHT - Sítios de ligação de adenosina trifosfato

NK - Células *natural killer*

NLR - Receptor de reconhecimento padrão do tipo NOD

NLRB ou NAIP - Receptor da família NLR contendo o domínio BIR na região N-terminal

NLRC ou NOD - Receptor da família NLR contendo o domínio CARD na região N-terminal

NLRP ou NALP - Receptor da família NLR contendo o domínio de pirina (PYD) na região N-terminal

nm - Nanômetro

NOD - Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (*nucleotide-binding oligomerization domain*)

NS - Proteína não estrutural

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

PFU - Unidade formadora de placa

pH - Potencial hidrogeniônico

prM - Proteína precursora da proteína de Membrana

PRR - Receptor de reconhecimento de padrões

PYD - Domínio de pirina

RIG-I - Gene indutor de ácido retinóico tipo I (*retinoic acid inducible gene – I*)

RLR - Receptor de reconhecimento padrão de helicases

RNA - Ácido ribonucleico

RPM - Rotação por minuto

RUBV - Vírus da rubéola (*Rubella virus*)

SBF - Soro bovino fetal

SGB - Síndrome de Guillain–Barré

SLEV - Vírus encefalite de *Saint Louis* (*Saint Louis encephalitis virus*)

SNC - Sistema nervoso central

TAM - Família de receptores celulares de tirosina quinase

THBMEC - Cultura de células endoteliais microvasculares de cérebro humano

THP-1 - Cultura de células de linhagem monocítica humana

TIM - Família de receptores celulares de fosfatidilserina

TLR - Recetor de reconhecimento padrão semelhante a *Toll* (*Toll like receptors*)

TNF - Fator de necrose tumoral

WNV - Vírus do Nilo Ocidental (*West Nile virus*)

YFV - Vírus da febre amarela (*Yellow Fever virus*)

ZIKV - Vírus Zika (*Zika virus*)

293T - Cultura de células renais de embrião humano expressando uma mutação no antígeno T

α - Alfa

β - Beta

γ - Gama

°C - Graus Celsius

μL - Microlitros

$\alpha\text{V}\beta\text{3}$ - Receptor de integrina (vitronectina)

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA	13
1.1	FLAVIVIRUS	13
1.1.1	Vírus Zika.....	17
1.2	COMPONENTE DA IMUNIDADE INATA EM RESPOSTA A INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA	19
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL:	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1	VÍRUS.....	27
3.2	ESTOQUE VIRAL.....	27
3.3	QUANTIFICAÇÃO VIRAL POR UNIDADE FORMADORA DE PLACA (PFU)	28
3.4	CINÉTICA DE INFECÇÃO VIRAL	29
3.5	ANÁLISE DA ATIVAÇÃO DE CASPASE-1 EM CULTURA DE CÉLULAS EA.hy926.....	29
3.6	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR EM CULTURA DE CÉLULAS EA.hy926.....	30
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4	RESULTADOS.....	31
4.1	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL NA CURVA DE CRESCIMENTO EM CÉLULAS VERO	31
4.2	SUSCEPTIBILIDADE VIRAL EM CULTURA DE CÉLULAS EA.hy926	32
4.3	DETECÇÃO DE CASPASE-1	34
4.4	VIABILIDADE CELULAR	34
5	DISCUSSÃO.....	36
6	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44

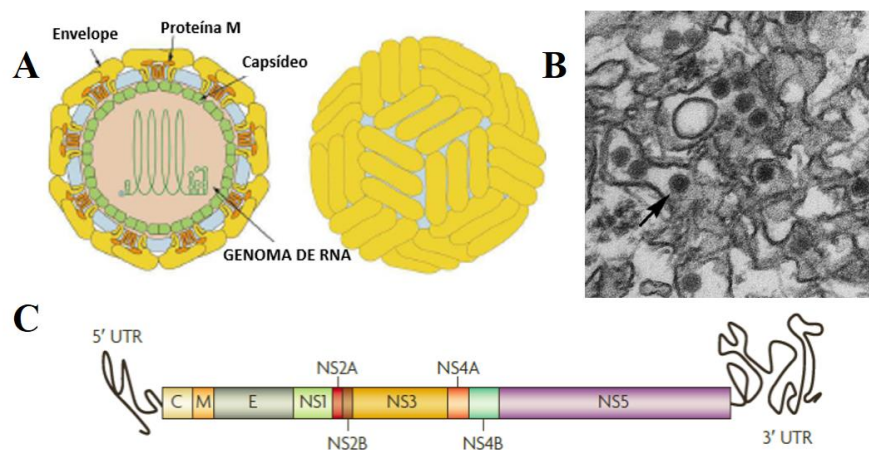
1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 FLAVIVIRUS

A família *Flaviviridae* é composta por 4 gêneros (*Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*) e os seus membros apresentam similaridades como morfologia, organização do genoma e estratégias de replicação. O gênero *Flavivirus* é composto por 53 espécies virais, entre elas: vírus da febre amarela (YFV - *Yellow fever virus*) - o protótipo do gênero - e vírus Dengue (DENV- *Dengue virus*), considerados vírus hemorrágicos; vírus da encefalite japonesa (JEV - *Japanese encephalitis virus*), vírus do Nilo Ocidental (WNV - *West Nile virus*) e vírus da encefalite *Saint Louis* (SLEV - *Saint Louis encephalitis virus*), considerados vírus encefalitogênicos; e também o vírus Zika (ZIKV - *Zika virus*) - sem categoria atribuída (GORBALENYA et al., 2018; LINDENBACK et al., 2007).

Os flavivírus são vírus esféricos, pequenos - aproximadamente 50 nanômetros de diâmetro, envelopados, apresentam simetria icosaédrica (Figura 1 A e B) e possuem o genoma constituído por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA) de polaridade positiva e não segmentado com cerca de 11 kilobases flanqueado pelas regiões 5' e 3' não codificantes. A única cadeia aberta de leitura codifica uma poliproteína que durante a replicação viral sofre clivagem, originando duas regiões gênicas, cujos genes codificam as proteínas estruturais (capsídeo - C, pré-membrana - prM/membrana - M e envelope - E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (LINDENBACK et al., 2007; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). (Figura 1)

Figura 1 - Estrutura viral (A e B) e organização do genoma dos flavivírus e seus produtos traducionais (C):



Fonte: Adaptada de Bharucha; Breuer, 2016; Guzman et al., 2010.

A proteína do capsídeo (11 kilodaltons - kDa) envolve o genoma viral, sendo o componente estrutural do nucleocapsídeo. A pré-membrana (26 kDa) é precursora da proteína de membrana e sua principal função é auxiliar a proteína do envelope a se dobrar corretamente, evitando a sua fusão prematura antes da maturação viral. No processo de liberação viral, a prM é clivada e origina a proteína M. A proteína E (53 kDa) é considerada a principal proteína estrutural do vírus e sua função primordial é de mediar a ligação da partícula viral com o receptor na célula hospedeira e a fusão das membranas, além de constituir o principal alvo para os anticorpos neutralizantes (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH et al., 2007; PERERA; KUHN, 2008).

A proteína não estrutural NS1 (48 kDa) auxilia na inibição da via de sinalização de receptores da imunidade inata, é altamente imunogênica e se encontra em níveis elevados no soro de pacientes com infecções primárias e secundárias durante a fase aguda e permanece em níveis menores nos primeiros dias de convalescença, fatos que a tornam um antígeno alvo para o diagnóstico precoce dos flavivírus (RICCIARDI-JORGE et al., 2017). A estrutura e função das proteínas NS2 e NS4 ainda não estão bem caracterizadas, mas provavelmente estão envolvidas em alterações da membrana e montagem do complexo de replicação viral, além da inibição da via de sinalização do interferon. Ambas as proteínas são divididas em duas subunidades, NS2 em NS2A (22 kDa) e NS2B (14 kDa) e NS4 em NS4A (16 kDa) e NS4B (27 kDa). A proteína NS2B, altamente conservada no gênero, atua como cofator para a clivagem das proteínas não estruturais, formando um complexo enzimático estável com a proteína NS3 (BRINTON, 2014; CHEN et al., 2017; KLEMA; PADMANABHAN; CHOI, 2015).

A proteína NS3 (70 kDa) é multifatorial, atuando na proteólise da poliproteína viral e como helicase, nucleotídeo trifosfatase e RNA 5' trifosfatase, desempenhando papel fundamental na replicação viral e na interação com as células hospedeiras (BRINTON, 2014; CHEN et al., 2017). E a proteína NS5 (104 kDa) é a maior e mais conservada proteína do gênero. Apresenta atividade de metiltransferase e de RNA polimerase RNA dependente, sendo fundamental para a replicação viral. Além disso, desempenha papel importante nos mecanismos de defesa viral contra a resposta imune inata do hospedeiro, uma vez que é capaz de inibir as vias de sinalização para a produção de interferon (PERERA; KUHN, 2008; SAEEDI; GEISS, 2013; SELISKO et al., 2014).

Os receptores celulares implicados com a entrada dos flavivírus são lectinas do tipo C (DC-SIGN e L-SIGN), receptores de manose, integrinas ($\alpha\beta3$), CD14, glicosaminoglicanos

sulfatados (heparan sulfato), receptores de fosfatidilserina (família TAM: TYRO3, AXL e MER e TIM: TIM-1, TIM-3 e TIM-4) e células com receptores para a porção Fc de imunoglobulinas. Estes receptores estão amplamente expressos em células fagocíticas do sistema imune – monócitos/macrófagos e células dendríticas – e células epiteliais, endoteliais e musculares presentes na derme, sangue, endotélio e múltiplos tecidos do hospedeiro (OLIVEIRA; PERON, 2019; SMIT et al., 2011).

O ciclo replicativo dos flavivírus tem início com a adsorção do vírus à célula alvo via endocitose mediada por receptor através da interação direta entre a proteína E com os receptores celulares seguido de fusão, dependente de um potencial hidrogeniônico (pH) ácido, com a membrana do endossoma. Este pH ácido provoca uma mudança conformacional no envelope, com consequente liberação do genoma viral no citoplasma celular. A RNA polimerase atua sobre o RNA do vírus, que é o próprio RNA mensageiro (mRNA), sintetizando RNA com polaridade negativa, que servirá de molde para a replicação do genoma viral. As unidades de proteína do capsídeo se agrupam e empacotam o genoma viral. Partículas virais imaturas são montadas no lúmen do retículo endoplasmático rugoso com a adição das glicoproteínas E e prM. Posteriormente, as partículas obtêm o seu envelope da membrana desta organela. No complexo de Golgi, estas partículas virais passam pelo processo de maturação, através da adição de cadeias laterais de carboidratos e clivagem da proteína prM, transformando-a na proteína M. As partículas virais maduras são então liberadas da célula através de exocitose pelos filamentos de actina (KLEMA; PADMANABHAN; CHOI, 2015; LINDENBACK et al., 2007; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

Apesar de compartilharem morfologia, estrutura genômica e estratégias de replicação, os flavivírus apresentam diferenças no que diz respeito aos seus hospedeiros naturais e ciclos de transmissão, que diferem entre si evolutivamente e ecologicamente (GAUNT et al., 2001; MOUREAU et al., 2015). No ciclo de transmissão silvestre, o vírus circula entre dois hospedeiros: vertebrado (reservatório) e invertebrado (mosquitos arbóreos), enquanto que no ciclo de transmissão urbana, o vírus circula entre humanos e mosquitos peridomiciliares (VALDERRAMA; DÍAZ; LÓPEZ-VERGÈS, 2017.).

Os flavivírus são agentes patogênicos humanos de importância em saúde pública e se encontram em constante emergência e reemergência, especialmente os transmitidos pelos mosquitos culicídeos *Aedes sp.* e *Culex sp.* Estes vetores têm sustentado a transmissão urbana bem-sucedida de muitos flavivírus antes restritos a ciclos silvestres em florestas da África e

Ásia. A combinação é simples: a presença de vetores competentes, hospedeiros suscetíveis e condições climáticas e ambientais adequadas são suficientes para a introdução de flavivírus em áreas onde estão originalmente ausentes. Outros fatores que contribuem diretamente para a rápida expansão das infecções por flavivírus ao longo do planeta é o transporte (não intencional) de vetores/hospedeiros infectados – reflexo da globalização, rápida adaptação desses mosquitos a novos ambientes, atividade comercial e aumento da atividade humana nas florestas – reflexo da urbanização, emergência de uma nova linhagem genética, vigilância médica/epidemiológica ineficaz, entre outros fatores (DAEP; MUÑOZ-JORDÁN; EUGENIN, 2014; HUANG et al., 2014).

A transmissão sem a participação do vetor, antes considerada rara, é reportada em casos de exposição ocupacional, indivíduos receptores de medula óssea, transfusão sanguínea e hemoderivados contaminados com o vírus, além da transmissão perinatal e através do leite materno (CHEN; WILSON, 2016). A transmissão vertical tem ganhado significativo reforço com a dispersão do ZIKV (BESNARD et al., 2014); além da transmissão sexual, até então não documentada para nenhum outro arbovírus (FOY et al., 2011; MUSSO et al., 2015), e tem apresentado impacto na transmissão do ZIKV, provavelmente tão significativo quanto a transmissão vetorial.

A maioria dos pacientes infectados por flavivírus são assintomáticos. Quando sintomática, a infecção apresenta curso bifásico, com a primeira fase caracterísca de uma doença febril aguda (febre, cefaleia, prostração, artralgia, mal-estar, conjuntivite e erupções cutâneas maculopapular) e limitada na qual o paciente se reestabelece em cerca de uma semana. Ou, pode sofrer progressão para a segunda fase, na qual raros pacientes apresentam sintomas severos com manifestações hemorrágicas e/ou encefálicas, podendo evoluir para óbito. Os sobreviventes, principalmente nos casos de encefalites, desenvolvem sequelas neurológicas persistentes (MLERA; MELIK; BLOOM, 2014).

Os flavivírus estão amplamente disseminados no planeta, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, representando constantes ameaças à saúde pública, além de causar importante impacto econômico. Os flavivírus mais importantes em termos de mortalidade e morbidade são os quatro sorotipos do DENV. O Brasil, país com 1/3 do território constituído por florestas tropicais, apresenta condições ideais para a múltipla circulação de flavivírus, sendo o *A. aegypti* o vetor epidemiologicamente mais importante. A dengue é endêmica, assim como a febre amarela silvestre e a zika. (FIGUEIREDO, 2000; MOTA et al., 2016).

1.1.1 Vírus Zika

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947, na Floresta Zika (Uganda, África), a partir de macacos rhesus febris utilizados como animais sentinelas para o monitoramento de febre amarela (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Os primeiros casos de infecção em humanos foram demonstrados através da presença de anticorpos neutralizantes contra o ZIKV em 1952 em indivíduos também da Uganda (SMITHBURN, 1952). Há três linhagens conhecidas e geograficamente distintas do vírus, duas africanas e uma asiática (HADDOW et al., 2012; MUSSO et al., 2015). Durante décadas restrito a estes dois continentes, somente em 2007 ocorreu o primeiro surto causado pelo ZIKV na Ilha Yap (Micronésia, Oceania) (DUFFY et al., 2009). Nenhum outro caso de transmissão foi reportado até que em 2013 ocorreu o segundo surto na Polinésia Francesa (Oceania), com 11% da população requerendo assistência médica (CAO-LORMEAU et al., 2014). No ano de 2014 foi confirmado o primeiro caso de ZIKV no continente Americano, na Ilha de Páscoa - Chile (CLARO; BRALIC, 2016) e no ano de 2015 o primeiro caso autóctone foi confirmado do Brasil (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). Análises filogenéticas demonstraram que a linhagem asiática causou a epidemia na América e estava relacionada a linhagem que circulou na Polinésia Francesa em 2013 (ENFISSI et al., 2016; FARIA et al., 2016). Após a identificação do surto no Brasil, o ZIKV se expandiu rapidamente entre outros países das Américas e depois para outros continentes, estando presente em mais de 70 países e territórios (YUN; LEE, 2017).

Como a zika é uma doença que tem desafiado os seres humanos com maior impacto apenas na última década, lacunas sobre a sua apresentação clínica e, especialmente, imunopatogênese ainda necessitam de mais estudos. A infecção pelo ZIKV é considerada assintomática na maioria dos infectados. Quando sintomática, apresenta-se geralmente de forma branda, sendo caracterizada por febre baixa (média de 38,5° Celsius (°C)), erupção cutânea maculopapular, hiperemia conjuntival, artralgia e edema de membros. Sinais de hemorragia têm sido raramente reportados, enquanto que distúrbios neurológicos como mielites e meningoencefalites são mais frequentes. Esta sintomatologia tende a regredir espontaneamente após 3-7 dias de evolução. Contudo, casos graves com complicações neurológicas, síndromes congênitas e óbitos também podem ocorrer (HAYES, 2009; MUSSO; GUBLER, 2016).

Durante o surto de ZIKV na Polinésia Francesa em 2013, um estudo retrospectivo confirmou um aumento no número de casos de Síndrome de Guillain-Barré (SGB) – doença autoimune caracterizada pela presença de imunocomplexos com reatividade cruzada entre antígenos provenientes de agentes infecciosos e antígenos localizados nos nervos periféricos com artícorpos específicos ou não (OEHLER et al., 2014). Além do número crescente de casos de SGB associado a ZIKV, um aumento significativo na incidência de microcefalia (desordem no desenvolvimento do sistema nervoso fetal caracterizado por uma acentuada redução do perímetro cefálico occipito-frontal - inferior a 32 centímetros (cm) ao nascimento, resultando em deficiência intelectual) em recém-nascidos na região Nordeste do Brasil também foi reconhecido durante a epidemia de ZIKV no Brasil, sugerindo mais uma possível associação (CALVET et al., 2016; MLAKAR et al., 2016) que foi posteriormente confirmada (ARAÚJO et al., 2016, 2017; KRAUER et al., 2017). Além da microcefalia, o leque de sequelas causadas devido a infecção pelo ZIKV durante a gravidez ainda é desconhecido e estão sendo frequentemente identificadas em recém-nascidos/crianças sem microcefalia em seus primeiros anos de vida, como retardo no desenvolvimento geral, problemas visuais, auditivos, déficit no aprendizado e na coordenação corporal. Além de células progenitoras neurais, recentemente o ZIKV também foi implicado com células nervosas maduras, afetando áreas cerebrais relacionadas com a memória e funções motoras, descoberta que amplia ainda mais o grau de desconhecimento do potencial patogênico deste vírus (FIGUEIREDO et al., 2019; RASMUSSEN et al., 2016; SCHIRMER; KAWWASS, 2016).

No ano de 2015, das 27 unidades federativas do Brasil, 19 notificaram casos autóctones de zika (BRASIL, 2016a) e 2.975 casos suspeitos de microcefalia associados à infecção por este vírus, dos quais 1.153 eram provenientes apenas do estado de Pernambuco (BRASIL, 2016b). Em 2016, foram notificados 215.319 casos suspeitos de infecção por ZIKV (taxa de incidência de 105,3 casos/100 mil habitantes), dos quais 60% foram confirmados laboratorialmente, com oito óbitos. Quanto às gestantes, o número de casos suspeitos foi de 17.000, com 65% confirmados por critérios clínicos, epidemiológicos ou laboratoriais (BRASIL, 2017). Nos anos de 2017 e 2018, o número de casos suspeitos notificados decresceu para 17.452 (taxa de incidência de 8,5 casos/100 mil habitantes) e 8.680 (taxa de incidência de 4,2 casos/100 mil habitantes), respectivamente, dos quais cerca de 50% em cada um dos anos foram confirmados laboratorialmente. No ano de 2019 o número de casos de ZIKV confirmados caracterizam a manutenção da endemia no Brasil (BRASIL, 2018, 2019).

Inicialmente o ZIKV não era considerado um flavivírus de alto potencial patogênico, uma vez que durante o surto fora de área endêmica não houve notificações de hospitalizações, manifestações hemorrágicas ou mortes (DUFFY et al., 2009). Foi durante a epidemia no Brasil, com o surgimento de relatos de complicações neurológicas, visuais e musculoesqueléticas, além do aumento significativo no número de casos de microcefalia no nordeste do país que a Organização Mundial de Saúde declarou, em 1º de fevereiro de 2016, emergência em saúde pública mundial (HEYMANN et al., 2016).

O ZIKV não é o único vírus que causa problemas neurológicos aos fetos durante o período de gestação. Outros vírus, como citomegalovírus (CMV – Cytomegalovirus), herpesvírus humano 5 (HHV-5 - Human betaherpesvirus 5), vírus da imunodeficiência humana (HIV - Human immunodeficiency virus) e rubéola (RUBV - Rubella virus) também são transmitidos verticalmente causando danos ao feto. Outros arbovírus como o vírus Chikungunya (CHIKV – Chikungunya virus), YFV, JEV, SLEV e WNV são conhecidos pelo seu neurotropismo e/ou neurovirulência (SMITH et al., 2016), porém o ZIKV é o único flavivírus reconhecido pela sua capacidade de causar microcefalia fetal, pois ultrapassa a barreira placentária, evade a resposta imunoprotetora da placenta, sustenta a replicação em vários tipos celulares deste tecido e posteriormente infecta o feto causando as lesões da síndrome congênita por ZIKV (FAIZAN et al., 2016; MING; TANG; SONG, 2016).

Como citado anteriormente os flavivírus que causam doenças em humanos são, genericamente, subdivididos em vírus hemorrágicos e encefalitogênicos. Os estudos filogenéticos realizados com cepas de ZIKV e de outros flavivírus evidenciam que não apenas clinicamente o ZIKV está em uma linha tênue por causar sintomas associados tanto à febre hemorrágica quanto a problemas encefálicos, mas também filogeneticamente, posicionando-se entre os dois grupos (CALVET et al., 2016; YE et al., 2016). Em virtude das limitações em preencher as lacunas sobre a sua epidemiologia e imunopatogênese, o ZIKV permanece sem uma categoria atribuída (BHARUCHA; BREUER, 2016).

1.2 COMPONENTE DA IMUNIDADE INATA EM RESPOSTA A INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA

Como as células-alvo de infecção pelo ZIKV são células imunes amplamente distribuídas nos tecidos epiteliais e mucosas e que estão relacionadas com a vigilância imunológica e com o processamento e apresentação de antígenos, a patogênese será direcionada pelo

contrabalanço do sucesso e das falhas da manipulação celular e da resposta imune induzida (LAURETI et al., 2018; PERERA-LECOIN et al., 2014).

A imunidade inata, primeira linha de defesa do organismo, constitui o principal tipo de resposta responsável pela delimitação das infecções agudas. A primeira resistência encontrada pelo ZIKV é a barreira física constitutiva imposta pela pele, mucosas e seus anexos, seguida do seu reconhecimento pelas células de defesa inata, resultando em dois principais tipos de resposta para combater a infecção: inflamação e defesa antiviral (GARCIA et al., 2017).

Este reconhecimento é primordialmente realizado por cinco grandes famílias de receptores sentinelas chamados coletivamente de receptores de reconhecimento padrão (PRR), que reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP) - estruturas altamente conservadas, exclusivas e compartilhadas entre grupos de patógenos que são essenciais à sua sobrevivência – e os padrões moleculares associados a danos (DAMP) – moléculas próprias exocitadas diante de um estresse/dano/lesão celular. Os PRR estão expressos em células fagocíticas, epiteliais, endoteliais e musculares com localização transmembrana e endossomal (receptores de lecitina do tipo C – CTLR e receptores Toll-like – TLR) e citosólica (TLR, receptores de helicases RIG-like – RLR, receptores NOD-like – NLR e receptores AIM-like (ALR) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; CEDILLO-BARRÓN et al., 2018; NAZMI et al., 2014).

Os mais importantes PAMP dos flavivírus reconhecidos pelos PRR são o material genético de RNA - seja ele em sua forma de fita simples ou dupla - e as glicoproteínas virais. Este reconhecimento induz o recrutamento de moléculas que ativam vias de sinalização para os fatores de transcrição dos genes IRF3 e IRF7 (fatores reguladores de interferon) cujos produtos gênicos resultam na produção de interferon tipo 1 (IFN-1): alfa (α) e beta (β) (CEDILLO-BARRÓN et al., 2018; ZHOU et al., 2018).

O IFN-1 é a principal resposta antiviral da célula que atua de forma autócrina – bloqueando os eventos de transcrição e tradução viral e estimulando a síntese de RNases para degradação do RNA viral; e parácrina, pois o IFN-1 secretado é sinalizador de estado antiviral para as células vizinhas através da geração de um microambiente que regula positivamente a expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe 1 (MHC-1) nessas células, bem como o recrutamento de linfócitos e aumento da citotoxicidade de células natural killer (NK) maximizando as chances de oportunidade para a apresentação de antígenos e eliminação das células infectadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; ZHOU et al., 2018). Os

flavivírus que infectam humanos possuem a capacidade de antagonizar as vias de sinalização de interferon mediada principalmente pela proteína NS5 através de diferentes mecanismos (BEST, 2017; YE et al., 2013), e o ZIKV também já tem sido reportado por induzir uma baixa sinalização de IFN do tipo 1 (IFN-1) em muitos tipos celulares de diferentes espécies, embora seja capaz de sustentar uma resposta pró-inflamatória (COLAVITA et al., 2018; KUMAR et al., 2016; PARDY; VALBON; RICHER, 2019).

Outra importante linha de defesa que também pode ser ativada pelo IFN-1 é a sinalização para vias pró-inflamatórias e pró-morte. A morte celular, depois da produção de IFN-1, constitui o mecanismo de defesa celular mais básico frente a uma infecção viral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019;). A morte de uma célula infectada por um vírus representa um dos principais mecanismos de dano celular, pois além da indução pelo hospedeiro para eliminar as células infectadas, a morte pode ser induzida pelo próprio vírus como estratégia de sobrevivência, disseminação e multiplicação no organismo. O que se sabe sobre a regulação deste mecanismo por vírus de RNA surgiu como base do que se conhecia para os vírus de DNA (ácido desoxirribonucleico), embora se acredite que para vírus de RNA esta regulação seja mais complexa (AMARA; MERCER, 2015; DANTHI, 2016; VICENZI et al., 2018).

As capases constituem uma família conservada de proteases de cisteína relacionadas com a homeostase celular através da regulação da morte e inflamação. São encontradas inativas no citoplasma em forma de pró-enzimas e são ativadas sequencialmente à nível pós-traducional através de clivagem proteolítica em seu sítio ativo. São, ainda, específicas e funcionalmente divididas de acordo com o tipo de morte celular, sendo as caspases desencadeadoras (caspase-8 e -9) e executoras (caspase-3, -6, -7) relacionadas com a morte por apoptose e as caspases pró-inflamatórias (caspase-1, -4, -5, -11 e -12) com a morte por piroptose (GALLUZZI et al., 2016; MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013; OPDENBOSCH; LAMKANF, 2019).

Como definido por Robbins; Cotran (2010), a apoptose é uma “via de morte celular induzida por um programa de suicídio celular altamente regulado no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam o seu próprio DNA e as proteínas dentro de bolhas apoptóticas” com as membranas citoplasmáticas e nucleares intactas até os últimos estágios no qual é gerado um microambiente propício para o recrutamento de células fagocíticas, que realizam a rápida e eficiente remoção dos corpos apoptóticos antes de qualquer sinal de inflamação (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). Em outro cenário, a piroptose é uma morte celular também programada, porém inflamatória e lítica, caracterizada pela formação de poros citoplasmáticos com consequente tumefação celular e exposição dos

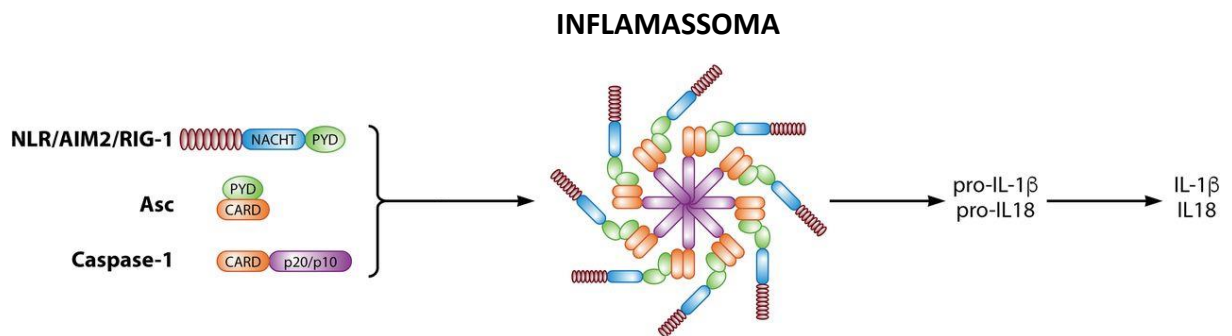
componentes intracelulares (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009; COOKSON; BRENNAN, 2001).

A piropitose é essencialmente induzida pelos NLR. Esta família é constituída por 22 proteínas em humanos e, estruturalmente, possuem três regiões: 1. Região C-terminal rica em repetições de leucina que atua no reconhecimento do ligante; 2. Região central de oligomerização e ligação a nucleotídeo (NACTH); e 3. Região N-terminal de interação proteína-proteína variável com um dos três seguintes domínios: CARD (domínio de recrutamento e ativação de caspases) – NLRC ou NOD; PYD (domínio de pirina) – NLRP ou NALP; ou BIR (proteína repetida inibidora da apoptose em baculovírus) – NLRB ou NAIP. O reconhecimento de um PAMP/DAMP na região LRR provoca uma mudança conformacional nestes receptores resultando na exposição dos sítios de ligação de adenosina trifosfato no domínio NACTH que inicia o seu processo de oligomerização, desencadeando uma cascata de sinalização específica para cada receptor (TING et al., 2008; TSCHOPP et al., 2003).

Os NLR contemplam a maioria dos receptores intracelulares capazes de formar o inflamassoma, sendo eles: NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4 e NAIP. O inflamassoma também pode ser formado, alternativamente, pelos receptores RIG-I (RLR) ou AIM2 (ALR) (BRYANT; FITZGERALD, 2009; DAVIS; WEN; TING, 2011). O inflamassoma induzido por NLRP3 é o mais estudado e melhor caracterizado até então (HE; HARA; NÚÑEZ, 2016; LAMKANFI; KANNEGANTI, 2010).

Inflamassoma é um complexo multiproteico intracitoplasmático de alto peso molecular formado estruturalmente por cinco a sete moléculas de NLR interligadas através da região NACTH, cada um com a caspase-1 ativa. Os NLR não-NLRC necessitam de uma molécula adaptadora: a ASC, cujo domínio CARD é o sítio de interação com o domínio CARD da caspase-1, que ao sofrer clivagem proteolítica no interior do inflamassoma, torna-se ativa e atuará como importante mediadora da regulação da inflamação, através da ativação das proteínas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (Figura 2). Consequentemente, outras citocinas pró-inflamatórias são expressas resultando na ativação de células imunologicamente comprometidas e no recrutamento de células responsáveis pelo reparo tecidual (LECHTENBERG; MACE; RIEDL, 2014; MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009). A formação do inflamassoma também pode ocorrer independente de caspase-1, denominado de via não canônica, e o processamento IL-1 β e IL-18 ocorre através das caspases-11 e -8 (GURUNG; KANNEGANTI, 2015; KAYAGAKI et al., 2011).

Figura 2 - Representação esquemática das estruturas básicas para a formação do inflamassoma com os seus produtos de maturação proteolítica.



Fonte: Adaptada de Quaresma, 2019.

Ainda não é conhecido como a caspase-1 induz a piroptose, mas se sabe que este tipo de morte é precedido pela formação do inflamassoma e ocorre nas células que apresentam ativação excessiva desta caspase. A piroptose atua no controle da infecção intracelular através da interrupção do sítio de replicação e exposição do patógeno a células fagocíticas com estimulação de sua atividade microbicida, além da modulação da resposta imune adaptativa com a importante polarização para células T auxiliares de perfil Th1 e Th17 devido ao microambiente de citocinas gerado (DENG; YU; WANG, 2019; MIAO; RAJAN; ADEREM, 2011; SOLLBERGER et al., 2014).

A maturação proteolítica das citocinas IL-1 β e IL-18 são dependentes de dois sinais: 1. Sinalização via PRR que resulta em ativação de fatores de transcrição nucleares (NF- κ B) que induzem a transcrição dos genes pró-IL-1 e pró-IL-18, e 2. Conversão da pró-IL-1 e pró-IL-18 em suas formas ativas através da atividade da caspase-1 via inflamassoma, desencadenando o processo inflamatório. Os DAMP liberados em consequência da piroptose são reconhecidos pelas células vizinhas e a morte celular é retroalimentada. O sinergismo de ambos os receptores – TLR e NLR - resultando em uma via de sinalização comum é a garantia de uma resposta altamente regulada que ao mesmo tempo que garante uma resposta inflamatória frente às infecções também protege o indivíduo de uma resposta exarcebada (NETEA et al., 2005; YIN et al., 2015).

Os PRR estão expressos principalmente em células fagocíticas, podendo um único macrófago expressar cerca de 50 tipos desses receptores. Assim, a maioria dos trabalhos geralmente realizados *in vitro* ou *in vivo* focaram neste tipo celular. No entanto, vários tipos celulares são capazes de ativar inflamassoma e liberar citocinas pró-inflamatórias, mesmo que

em uma quantidade menor. O tecido vascular, que engloba as células endoteliais, é capaz de ativar o inflamassoma em um estado estritamente regulado, pois constitui um sítio de privilégio para a inflamação (YIN et al., 2013). O inflamassoma nestas células tem sido investigado principalmente em doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (ZHAOLIN et al., 2018), mas sendo este tecido permissivo também a infecções por microorganismos, é importante expandir essa investigação nesta vertente, uma vez que a célula endotelial é também uma célula imune importante na secreção de citocinas e quimiocinas, além de atuar no extravasamento de leucócitos e orquestrar a resposta inflamatória (OPITZ et al., 2007).

De uma maneira geral, embora muitas informações tenham sido descritas na última década sobre a resposta antiviral do inflamassoma, os resultados neste campo ainda são muito primitivos, uma vez que o real papel da ativação do inflamassoma, a relevância da piropitose na célula infectada, a contribuição relativa de cada inflamassoma ativado em diferentes tipos celulares, ou ainda, a importância de múltiplas ativações na mesma célula ainda não está clara. Os vírus de DNA e de RNA ativam o inflamassoma através da via canônica em resposta ao seu reconhecimento principalmente pelos receptores AIM2, IFI16 e NLRP3. Neste contexto, o vírus da Influenza A é o melhor caracterizado (SHRIVASTAVA et al., 2016).

Os receptores AIM2 e IFI16, que possuem localização citoplasmática e nuclear, respectivamente, ativam o inflamassoma ao reconhecem vírus de DNA, como o vírus vaccinea (*Vaccinia virus*), Epstein-barr (EBV - Human gammaherpesvirus 4), papilomavírus humano subtipos 16 (HPV-16) e 18 (HPV-18) (*Gammapapillomavirus 16* e *Gammapapillomavirus 18*), herpesvírus humano associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV) (*Human gammaherpesvirus 8*), vírus da hepatite B (HBV) (*Hepatitis B virus*), entre outros. Tratando-se de vírus de RNA, temos vários membros da família Picornaviridae (poliovírus, enterovírus 71, rinovírus, vírus da encefalomiocardite), rotavírus, vírus sincicial respiratório, Influenza A, HIV e o vírus da hepatite C (HCV) (*Hepatitis C virus*) (Família Flaviviridae, gênero *Hapacivirus*), além de vírus altamente patogênicos e causadores de febres hemorrágicas virais (Ebola e Hantavírus), arbovírus (Rift Valley e CHIKV), e também flavivírus encefalitogênicos e hemorrágicos (WNV, JEV e DENV) que são capazes de montar uma resposta via inflamassoma ativando o receptor NLRP3 (CHEN; ICHINOHE, 2015; GRAM; FRENKEL; RESSING, 2012; SHRIVASTAVA et al., 2016).

A morte de uma célula infectada com um vírus em consequência da formação do inflamassoma e indução da piropitose é importante devido a restrição dos ninchos de replicação e o fato de alguns vírus possuírem a capacidade de codificar inibidores da

formação do inflamassoma e promover a evasão da defesa imune inata antiviral fortalece a ideia de que essa resposta é importante para a inibição da replicação viral. Além de que o seu entendimento ainda é primordial para a elucidação da patogênese da doença, uma vez que diante de resposta inflamatória, é importante investigar se tais mecanismos atuam de fato na defesa do hospedeiro ou contribuem para exacerbar a infecção (LUPFER; MALIK; KANNEGANTIA, 2015; RATHINAM; FITZGERALD, 2010).

Assim, considerando o relevante papel do inflamassoma em resposta às doenças infecciosas virais, é importante a investigação de sua ativação em resposta ao ZIKV para colaborar com a elucidação dos mecanismos de seu reconhecimento, desenvolvimento da resposta imune inata e modulação da adaptativa, controle e cura da infecção, contribuindo, portanto, com a compreensão de sua patogenia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar a ativação do inflamassoma na resposta imunológica induzida pelo vírus Zika em modelo experimental *in vitro* utilizando células endoteliais de cordão umbilical humano (linhagem EA.hy926).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1°. Verificar se a infecção pelo vírus Zika é capaz de induzir a ativação de caspase-1 nas células EA.hy926;
- 2°. Comparar os níveis de ativação de caspase-1 induzidos por dois diferentes isolados do vírus Zika;
- 3°. Determinar a viabilidade das células EA.hy926 submetidas a infecção pelo vírus Zika;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 VÍRUS

Foram utilizados dois isolados de ZIKV da linhagem asiática, sendo um proveniente do isolamento a partir de uma amostra de paciente com quadro clínico autolimitado em amostra de soro (BeH815744) e outro proveniente de uma amostra de paciente com doença neurológica em amostra de tecido cerebral (BeH818305).

Os vírus utilizados neste trabalho são pertencentes ao acervo da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas/Secretária de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde.

3.2 ESTOQUE VIRAL

Células Vero (linhagem contínua do rim do macaco verde africano) foram cultivadas em garrafas plásticas para cultivo celular de 75cm² em meio Dulbecco Mem (DMEM) (Gibco) suplementado com 1% de antibióticos (penicilina-estreptomicina) (Gibco) e 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco) inativado para crescimento ou 2% de SBF inativado para manutenção, e submetidas a passagens semanais das monocamadas confluentes. A cultura celular permaneceu incubada em estufa a 37°C na presença de 5% de gás carbônico (CO₂).

Com 24 horas após o subcultivo, tempo em que as células atingiam uma monocamada confluyente maior que 90%, adicionou-se 0,5 mL de suspensão viral que permaneceu em contato com as células durante aproximadamente 1 hora para a adsorção viral com leves agitações manuais a cada 15 minutos. Após esse tempo, foi adicionado à garrafa 15 mL de meio DMEM 2% sendo então mantida na estufa com examinação a cada 24 horas. O sobrenadante celular foi coletado com base na observação microscópica de efeito citopático (descolamento celular), submetido à centrifugação de 3.000 rotações por minuto (RPM) durante 5 minutos a 4°C, aliqüotados em criotubos estéreis e armazenados a -70°C para posterior quantificação. Após a coleta de sobrenadante, se a monocamada celular ainda aderida à garrafa fosse superior a 50%, mais meio DMEM 2% era adicionado e a garrafa permaneceria incubada por mais 24 horas para nova coleta, e assim até não haver mais células aderidas.

3.3 QUANTIFICAÇÃO VIRAL POR UNIDADE FORMADORA DE PLACA (PFU)

A monocamada confluyente de células Vero em garrafas plásticas para cultivo celular de 175cm², pós-remoção do meio de crescimento e lavagem com tampão fosfato salino (PBS) 1X, foi incubada com 3 mL de tripsina (Bioworld) por aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente para a remoção das células aderidas à parede da garrafa, sendo posteriormente ressuspensas em 9 mL de meio DMEM 10%. Após homogeneização, foi realizada uma diluição 1:10 da suspensão celular em meio de cultura para a quantificação no aparelho automatizado MOXI Z Mini (Orflo) e posterior ajuste para uma concentração de 6×10^5 células/mL. A suspensão celular final foi semeada em placas para cultivo celular com de 24 cavidades e esta placa foi incubada por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂ para a formação da monocamada confluyente.

Diluições seriadas decimais até 10⁻⁶ foram preparadas em meio DMEM 2% utilizando o sobrenadante do estoque viral. O meio de cultura da placa de 24 poços foi removido e 100 µL de cada diluição foi adicionado nas cavidades em quadruplicata. As placas foram então incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por aproximadamente 1 hora, com leves agitações manuais a cada 15 minutos para facilitar a adsorção viral. Após este período, o inóculo viral foi removido e 0,5 mL de Overlay (meio DMEM 2% e carboximetilcelulose (Sigma) a 1,6 % estéril) foi adicionado em cada cavidade da placa, que ficou incubada a 37°C em 5% de CO₂ durante cinco dias.

Chegado o dia da revelação, a placa foi mergulhada em solução fixadora (formaldeído 1:10) (Sigma) durante o tempo mínimo de 30 minutos, submetida a sucessivas lavagens em água destilada e coradas com 300 µL de cristal violeta 2,5% (Sigma) durante o tempo mínimo de 3 minutos. O cristal violeta foi então removido e as placas foram mergulhadas cuidadosamente em água comum com posterior secagem. Para a quantificação do título viral foi considerado a maior diluição na qual se foi possível realizar a contagem das placas. O título viral foi expresso em unidades formadoras de placa (PFU/mL).

Na primeira quantificação para cada isolado de vírus deste estudo foi avaliado qual o dia ideal de revelação das placas nos tempos de três, quatro, cinco e seis dias, sendo definido o tempo de cinco dias para revelação.

3.4 CINÉTICA DE INFECÇÃO VIRAL

As curvas de crescimento foram realizadas para todos os isolados virais deste trabalho tanto em células Vero como em células EA.hy926.

As células foram semeadas em placas de 12 poços em uma concentração de 6×10^5 células/cavidade e permaneceram incubadas em estufa por 24 horas antes de realizar a inoculação viral conforme já descrito anteriormente. A multiplicidade de infecção (MOI) utilizada neste trabalho foi de 0,01 (MOI = 0,01). Após a adsorção viral, o inóculo viral foi removido e 1 mL de meio DMEM 2% foi adicionado em cada poço.

As coletas foram realizadas a cada 24 horas, sendo consideradas 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 3.000 rpm durante 5 minutos, alíquotados em volumes de aproximadamente 470 μ L em criotubos estéreis e armazenados à -70°C para posterior quantificação.

As curvas de crescimento foram conduzidas em triplicata e a quantificação foi realizada em duplicata em ensaios de unidade formadora de placa com células Vero.

3.5 ANÁLISE DA ATIVAÇÃO DE CASPASE-1 EM CULTURA DE CÉLULAS EA.hy926

A análise de atividade da caspase-1 em cultura de células EA.hy926 foi realizada no equipamento GloMaxTM Multi Detection System (Promega) com a utilização do kit Caspase-Glo[®] 1 Inflammasome Assay (Promega) baseado na metodologia de bioluminescência na qual o sinal luminescente gerado é proporcional à atividade da caspase.

As células EA.hy926 foram semeadas em garrafas para cultivo celular de 25 cm² em um total de $2,5 \times 10^6$ células e submetidas a infecção 24 horas depois. Todas as condições de incubação e infecção foram idênticas às descritas previamente. O experimento foi realizado em duplicata biológica e técnica e conduzido de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante.

As leituras foram realizadas nos tempos de 24, 36 e 48 horas pós-infecção. As células foram submetidas à tripsinização e ajustadas à quantidade de 25.000 células/cavidade para análise utilizando placas de 96 poços.

A placa com o material a ser analisado permaneceu incubada à temperatura ambiente durante 1 hora e foi submetida a leitura 60 minutos após a adição do reagente.

3.6 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR EM CULTURA DE CÉLULAS EA.hy926

A análise da viabilidade celular em cultura de células EA.hy926 foi realizada no equipamento GloMax™ Multi Detection System (Promega) com a utilização do kit CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) baseado na metodologia de fluorescência na qual o sinal fluorescente gerado é proporcional à capacidade metabólica celular em reduzir o corante indicador (resazurina) do kit.

Este experimento foi conduzido com todas as condições descritas anteriormente, pois foram realizados em paralelo. Também foi realizado em duplicata biológica e técnica e de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante.

As leituras foram realizadas nos tempos de 24, 36 e 48 horas pós-infecção nas células submetidas à tripsinização e ajustadas à quantidade de 50.000 células/cavidade para análise utilizando placas apropriadas de 96 poços.

A placa com o material analisado permaneceu incubada na estufa a 37°C em 5% de CO₂ e a leitura foi realizada 180 minutos após a adição do reagente.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística deste trabalho foi realizada no programa *GraphPad Prism8* através do método de análise de variância (*Ordinary one-way ANOVA*) seguido do teste de *Tukey*, e os valores de “p” iguais ou menores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

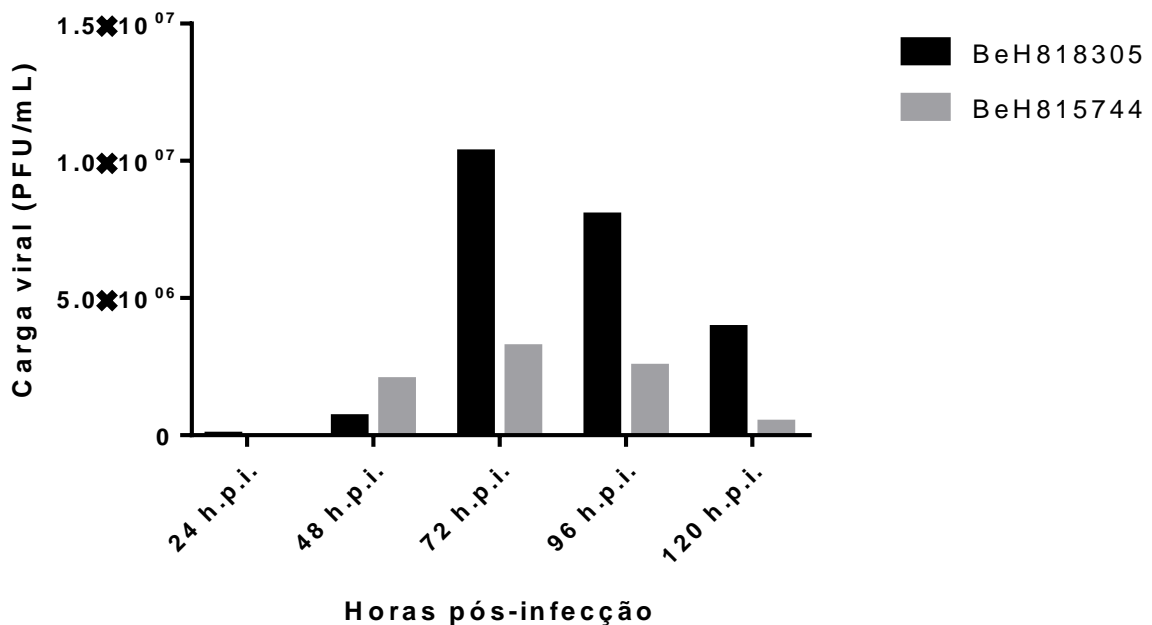
4 RESULTADOS

4.1 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL NA CURVA DE CRESCIMENTO EM CÉLULAS VERO

A quantificação da carga viral foi apenas em cultura de células Vero. Ambos os vírus apresentaram um padrão de crescimento semelhante durante o curso da infecção, sendo o pico da carga viral detectado com 72 horas pós-infecção, neste tempo o ZIKV isolado de doença neurológica (BeH818305) atingiu $1,03 \times 10^7$ PFU/mL enquanto o ZIKV isolado de doença autolimitada (BeH815744) atingiu $3,21 \times 10^6$ PFU/mL.

A figura 3 apresenta a quantificação viral dos sobrenadantes da cultura celular por meio de ensaio de placa de 24 a 120 horas pós-infecção com o gráfico apresentando uma configuração visual de “U invertido”.

Figura 3 – Curva de crescimento do ZIKV na doença neurológica (BeH818305) e autolimitada (BeH815744) em cultura de células Vero.

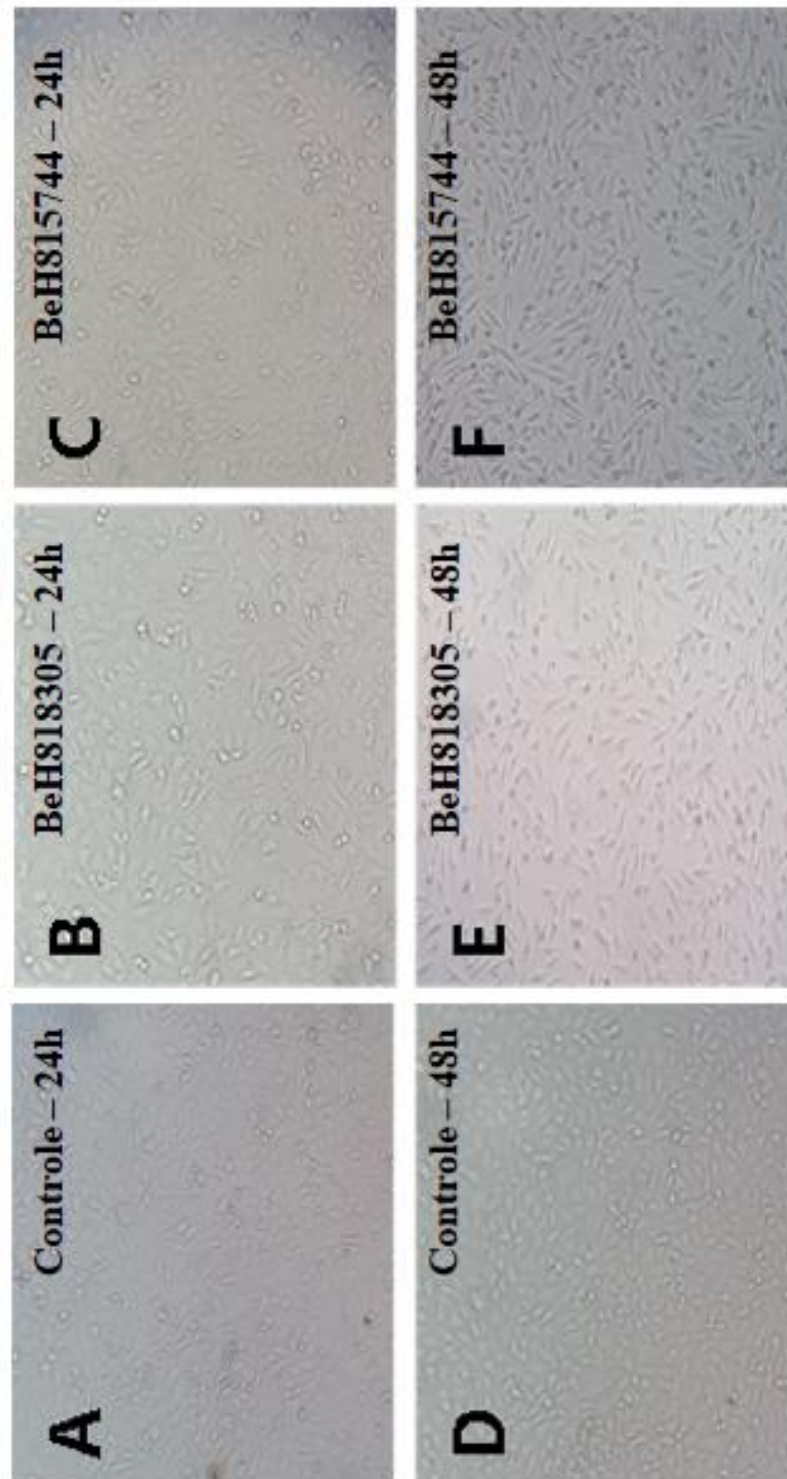


Fonte: Próprio autor.

4.2 SUSCEPTIBILIDADE VIRAL EM CULTURA DE CÉLULAS EA.hy926

A infecção da cultura celular EA.hy926 pelos ZIKV foi observada diretamente em microscópio óptico invertido (40x) durante o curso temporal do experimento. Conforme observado na figura 4, nas primeiras 24 horas pós-infecção não houveram alterações significativas visíveis na monocamada celular causada pelos isolados de ZIKV de doença neurológica (BeH818305) (B) e autolimitada (BeH815744) (C) em relação as células não infectadas (A). Ao passo que no período de 48 horas pós-infecção o efeito citopático induzido pelos isolados virais se tornam identificáveis, enquanto que nas células não infectadas (D) se observa uma maior densidade celular caracterizada pelo crescimento ativo e logarítmico das células em cultura, ao passo que nas células infectadas se observou a rarefação da monocamada. O efeito citopático no descolamento celular induzido pelo isolado de ZIKV de doença neurológica (BeH818305) (E) é visivelmente maior que o induzido pelo ZIKV de doença autolimitada (BeH815744) (F); esta última observação também era identificada nas infecções realizadas em cultura de células Vero.

Figura 4 – Cultura de células EA.hy926 infectadas com ZIKV nos períodos de 24 e 48 horas pós-infecção.



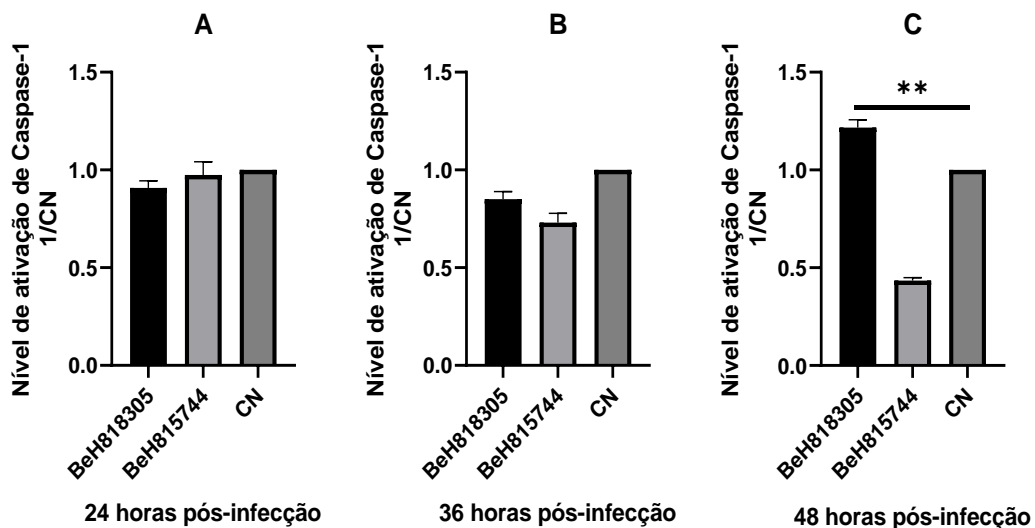
Fonte: Próprio autor.

Legenda: Todas as imagens são de cultura de células EA.hy926, sendo A e E células não infectadas nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente; B e E: células infectadas com o isolado de ZIKV de doença neurológica (BeH818305) nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente; e C e F células infectadas com o isolado de ZIKV de doença autolimitada (BeH815744) nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente.

4.3 DETECÇÃO DE CASPASE-1

No período de 24 horas pós-infecção houve uma pequena diferença na leitura das células infectadas em relação ao controle (Figura 5), ao passo que no período de 48 horas pós-infecção foi possível observar que o ZIKV isolado de doença neurológica (BeH818305) obteve um aumento estatisticamente significativo de expressão de caspase-1 ativa, diferentemente do ZIKV isolado de doença autolimitada (BeH815744) que seguiu o curso da infecção com níveis de detecção progressivamente inferiores em relação ao controle negativo (Figura 5).

Figura 5 – Nível de ativação de caspase-1 frente a infecção pelo ZIKV nos períodos de 24 (A), 36 (B) e 48 (C) horas pós-infecção em cultura de células EA.hy926.



Fonte: Próprio autor.

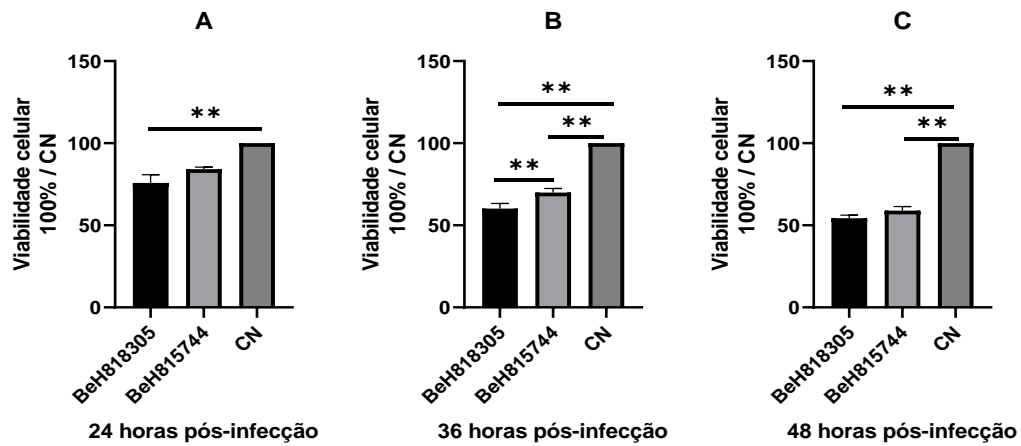
Legenda: Valores apresentados em escala linear em razão ao controle negativo (células não infectadas). (** = $p < 0,05$)

4.4 VIABILIDADE CELULAR

A saúde mitocondrial e a viabilidade celular também foram analisadas durante o curso experimental deste trabalho. Conforme se observa na figura 6, para ambos os isolados virais foi possível detectar a redução da viabilidade celular desde a primeira análise com 24 horas pós-infecção (A), sendo esta redução estatisticamente significativa para o ZIKV isolado de

doença neurológica (BeH818305) em relação ao controle negativo. A redução na viabilidade celular desce progressivamente para ambos os vírus durante o curso experimental (B), até que no período de 48 horas pós-infecção (C), esta redução foi estatisticamente significativa entre as células infectadas com ambos os vírus em relação ao controle, porém não entre elas.

Figura 6 – Viabilidade celular em cultura de células EA.hy926 frente a infecção pelos ZIKV nos períodos de 24 (A), 36 (B) e 48 (C) horas pós infecção.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Valores apresentados em escala percentual proporcional ao controle negativo (considerado com viabilidade celular de 100%). (** = $p < 0,05$)

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou se o ZIKV é capaz de induzir a formação/ativação do inflamassoma em cultura de células endoteliais da linhagem EA.hy926 através da detecção dos níveis de caspase-1, componente essencial para a formação deste complexo. A ativação de caspase-1 é indicativo de um ambiente inflamatório devido o processamento proteolítico das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, podendo levar a célula à morte por piropitose (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009).

O principal ponto limitante deste trabalho foi a impossibilidade de realizar a curva de crescimento dos ZIKV na célula EA.hy926 para entender o perfil de replicação do vírus neste tecido, bem como para efeitos de comparação em relação as células Vero – célula extensivamente utilizada para isolamento, diagnóstico e múltiplos trabalhos com arbovírus (CACEDA; KOCHER, 2007). Porém, a permissividade das células EA.hy926 ao ZIKV foi confirmada e a sua capacidade de sustentar a replicação viral está apoiada na literatura, inclusive em artigos com MOI de 0.005, exatamente metade do conduzido neste trabalho (BARR et al., 2016), além também da permissividade confirmada para outro flavivirus fortemente relacionados, como o DENV (BIRUNGI et al., 2010).

Durante a observação da cultura celular infectada com os isolados do ZIKV no microscópio invertido foi possível notar que a integridade da monocamada celular ainda estava preservada nas primeiras 24 horas pós-infecção. Após 48 horas de infecção se observou significativa redução da integridade celular. Também como citado, esse efeito citopático era observado de forma muito semelhante na cultura de células Vero, na qual era possível visualizar uma quantidade já significativamente reduzida de células aderidas entre 48-72 horas pós-infecção, coincidindo com o início do pico de quantificação da carga viral. Dadas essas semelhanças, acreditamos que uma curva de crescimento de pico semelhante caracterize também o curso da replicação viral do ZIKV na célula EA.hy926.

O ZIKV BeH818305, isolado de um caso neurológico, induziu a ativação de caspase-1 nas células EA.hy926, indicando a ativação do inflamassoma. Um experimento piloto foi realizado para avaliar a expressão relativa de mRNA dessas células infectadas com este isolado de ZIKV com 6 horas pós-infecção. Os dados revelaram a expressão de mRNA para IFN- γ , IFN- β e IL-6 não expressos na célula não-infectada, além da expressão de mRNA para IL-1 β em altos níveis baseando-se na proporcionalidade inversa entre Ct (cycle threshold) e quantidade de RNA presente na amostra. Novos experimentos precisam ser realizados e

analisados para permitir a sustentação de inferências, mas já temos os primeiros indícios de um ambiente inflamatório em decorrência da infecção das células EA.hy926.

Células endoteliais também constituem a barreira hematoencefálica, conferindo proteção estritamente seletiva para o sistema nervoso central (SNC), sítio imunoprivilegiado. O acesso de microorganismos neste compartimento como resultado da descontinuidade da integridade da barreira pode ocorrer tanto por infecção direta dessas células como também decorrente de danos provocados pela resposta imune induzida. O JEV, flavivírus neurotrópico, é capaz de infectar células endoteliais microvasculares do cérebro humano (THBMEC), levando estas células à morte celular por apoptose e aumento da permeabilidade no tecido (AL-OBAIDI et al., 2017). Experimentos conduzidos *in vitro* com as células THBMEC na presença da IL-1 β resultou em um estado de inflamação celular caracterizado pela quebra da camada endotelial com o aumento da permeabilidade celular como também aumento da expressão de células de adesão que permitem a migração de leucócitos pelo mecanismo de rolamento e de quimiocinas para a quimioatração de linfócitos, promovendo a neuroinflamação (LABUS et al., 2014; MAN et al., 2008). Mladinich, Schwedes e Mackow (2017), utilizando este mesmo tipo celular como modelo para infecção pelo ZIKV, observou que embora o ZIKV não tenha causado significativo efeito citopático a ponto de alterar a permeabilidade celular, a replicação viral foi sustentada do primeiro ao nono dia, conferindo um importante sítio ativo para o vírus na barreira cuja principal função é proteger o cérebro.

Dado o neurotropismo do ZIKV, a ativação do inflamassoma em células U87-MG (célula epitelial de tecido cerebral humano) já foi investigado por Tricarico et al. (2017) e esses autores observaram que em 48 horas pós-infecção, o ZIKV ativava o inflamassoma nessas células via NLRP3 com aumento da expressão relativa do mRNA de caspase-1 e IL-1 β , além da observação da diminuição da viabilidade celular 48 horas pós-infecção e progressivo decréscimo de viabilidade nas 72 horas pós-infecção, caracterizando a neuroinflamação. Ainda neste compartimento, porém com tecido humano, Sousa et al. (2018) analisando o parênquima neural de natimortos microcefálicos confirmadamente diagnosticados para a infecção por ZIKV em relação a natimortos por outros motivos de arquitetura cerebral preservada observaram uma maior expressão de receptores envolvidos com a formação do inflamassoma, como NLRP1, NLRP3 e AIM2, além da identificação das citocinas IL-1 β e IL-18.

Vírus neurotrópicos relacionados, como o WNV também responde a infecção no SNC com a montagem do inflamassoma NLRP3 e sinalização de IL-1 β que, em sinergismo com a

resposta de IFN, pode atuar com potencial protetor no combater a replicação viral controlando o curso da infecção (RAMOS et al., 2012), em contraste do observado para o JEV em modelo murinho, no qual a mediação da neuroinflamação promoveu o aumento do dano patológico através da indução da morte celular (KAUSHIK et al., 2012).

A ativação do inflamassoma pelo ZIKV foi avaliada também *in vitro* em células de linhagem monocítica de humanos (THP-1), renal (293T) e em cultura primária de macrófagos isolados de medula óssea de camundongos, bem como avaliado também *in vivo* em soro e tecido neural de camundongos no trabalho conduzido por He et al. (2018), confirmando que o ZIKV ativa o inflamassoma NLRP3 com liberação de altos níveis de IL-1 β dependente de caspase-1 principalmente como resultado da estimulação pela glicoproteína viral NS5. Wang et al. (2018) estenderam essa investigação para analisar a ativação do inflamassoma em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com a infecção aguda pelo ZIKV em comparação com PBMC de pessoas sem infecção pelo ZIKV, confirmando também o comprometimento do receptor NLRP3 como receptor ativado, uma vez que em camundongos knockout para este receptor (C57BL/6 NLRP3^{-/-}) foi verificado uma atenuação da ativação de IL-1 β induzido pelo ZIKV.

Os flavivírus são clinicamente reconhecidos pela sua capacidade de infectar tecido renal e são constantemente identificados em amostras biológicas de urina (BURDMANN, 2019). Esse contexto está sendo explorado para o ZIKV dada a observação de que carga viral na urina é maior e mais duradoura que no soro, estimulando a investigação da patogênese deste vírus em células e tecido renal, conforme estudo de Liu et al. (2019) conduzido *in vitro* com células HEK293 (linhagem celular de rim embrionário humano) que observou persistência na infecção e crescimento lento em relação ao controle. Alcendor (2017) infectou células primárias de tecido renal e verificou aumento transcricional de IL-1 β e outras citocinas inflamatórias em resposta a infecção principalmente no tempo de 72 horas pós-infecção, inclusive células endoteliais deste tecido, que também foram permissivas a infecção pelo vírus embora a resposta inflamatória tenha sido considerável na cultura de célula epitelial. Liu et al. (2019) observaram a formação no inflamassoma via NLRP3 em tecido renal de camundongos adultos e recém-nascidos induzidos pela infecção pelo ZIKV acompanhado da produção de citocinas inflamatórias, infiltrado inflamatório e dano celular renal implicando diretamente na função vital de reabsorção do órgão.

O ZIKV tem revelado uma forte afinidade por células placentárias. De fato, Driggers et al. (2016) relataram o caso de uma mulher grávida que adquiriu a infecção pelo ZIKV por

via vetorial na 11^a semana de gestação e apresentou os sintomas clássicos na 12^a semana, seguido da confirmação laboratorial. Entre a 16^a e a 20^a semanas de gestação a ultrassonografia identificou uma diminuição na circunferência da cabeça do feto, bem como uma anatomia intracraniana anormal, além de outras anomalias. Esta mulher, residente em Washington (Estados Unidos), optou por interromper a gravidez. A placenta foi submetida à examinação patológica e cópias virais do ZIKV foram identificadas na placenta, membranas extra placentárias e cordão umbilical. A examinação *ex vivo* dessa placenta, realizada por Rosenberg et al. (2017), descreveu todos os anexos dentro da normalidade para a idade gestacional e não foram detectados indícios de inflamações, hemorragias, tampouco processos de fibrose ou necrose. A imunomarcagem por CD163 e CD68 identificou uma volumosa população de macrófagos estromais denominados de células de Hofbauer, essas células se encontravam em intensa hiperplasia, além da presença do ZIKV confirmada por hibridização. Ribeiro et al. (2018), dissecaram vilosidades coriônicas de dez placentas de grávidas saudáveis e as células extraídas desse tecido foram desafiadas a infecção pelo ZIKV, e ao contrário do relatado anteriormente, este grupo identificou aumento da replicação tempo-dependente, inflamação caracterizada por uma série de citocinas pró-inflamatórias (IFN, IL-6, IL-1 β , TNF- α), além de injúria e morte por apoptose.

As células de Hofbauer são células derivadas da linhagem monocítica e constituem os macrófagos placentários. Estas células são de origem fetal e estão presentes nas vilosidades coriônicas entre o 10^o e o 18^o dias de gestação como um componente ordinário do estroma destas vilosidades. Porém, o estado de hiperplasia destas células é anormal e ocorre em condições patológicas da gravidez (GRIGORIADIS et al., 2013; TANG et al., 2011). Quicke et al. (2016) desafiando células de Hofbauer primárias da placenta humana com um ZIKV circulante nas Américas mostraram não apenas que o ZIKV é capaz de infectar e sustentar uma replicação nestas células que entram em estado antiviral através da produção de IFN-1 e citocinas pró-inflamatórias, mas também sugerindo que a amplificação viral nestas células pode estar relacionada à circulação fetal do vírus prolongada, bem como representar uma importante via de transmissão placentária para o ZIKV, permitindo desse modo a sua disseminação para o cérebro. Outros estudos também sustentaram esta possibilidade de o ZIKV utilizar a capacidade migratória das células de Hofbauer para alcançar o feto (SIMONI et al., 2017; SCHWARTZ, 2017). Além das células de Hofbauer, o ZIKV também infecta e se replica em várias células primárias isoladas de placentas humanas de idades gestacionais precoces, médias e tardias, como os citotrofoblastos, células do epitélio amniótico, células

endoteliais da veia umbilical, células progenitoras do trofoblasto e fibroblastos (AAGAARD et al., 2017; COSTA et al., 2016; PAGANI et al., 2017; RICHARD et al., 2017; SHERIDAN et al., 2017; TABATA et al., 2016).

Chan et al. (2016) testaram a susceptibilidade de 33 culturas de células de linhagens contínuas para o ZIKV em comparação com DENV-2. Destas 33 culturas de células, 18 eram de células humanas na qual uma célula placentária, a JEG-3, estava inclusa. A maior média de cópias virais e os efeitos citopáticos mais proeminentes para o ZIKV foram encontrados justamente na célula placentária, confirmando o alto grau de susceptibilidade desta célula à infecção pelo ZIKV. Diferente do observado para ZIKV, o DENV-2 não conseguiu manter uma replicação produtiva nessa linhagem placentária.

A célula endotelial EA.hy926 é estudada de maneira mais aprofundada em relação a infecção pelo DENV. Com efeito, estudos avaliaram a alteração do metabolismo celular (BIRUNGI et al., 2010), indução de apoptose (LONG et al., 2013) e aumento da permeabilidade vascular (HOTTZ et al., 2013; INYOO; SUTTITHEPTUMRONG; PATTANAKITSAKUL, 2017). Puerta-Guardo et al. (2019) demonstraram que a NS1 dos flavivírus interage com células endoteliais de diferentes órgãos resultando em hipermeabilidade tanto in vitro quanto in vivo. Richard et al. (2017) mostraram que o ZIKV, ao contrário de outros flavivirus relacionados como DENV e WNV, infecta células primárias endoteliais fetais com maior eficiência, fato que pode estar relacionado com o acesso do vírus ao feto durante a gestação. Além disso, o ZIKV também já foi implicado com mecanismos de morte nessas células, por mecanismos de autofagia (PENG et al., 2018) e apoptose (ANFASA et al., 2019).

A associação entre o ZIKV e microcefalia começou a ser observada com a linhagem asiática e alguns trabalhos tem sido conduzido no sentido de avaliar as diferenças na fisiopatogênese entre as linhagens asiática e africana do ZIKV tanto in vitro quanto in vivo. A linhagem africana apresenta uma maior infectividade caracterizada por maiores níveis de carga viral e indução rápida de morte/lise celular nas múltiplas observações, enquanto a linhagem asiática parece menos patogênica e apresenta persistência de infecção, o que talvez explicasse a evolução da gravidez com danos cerebrais associados (SHERIDAN et al., 2017; SIMONI et al., 2017; SIMONIN et al., 2016; TRIPATHI et al., 2017). Este trabalho foi conduzido com dois isolados do ZIKV, ambos da linhagem asiática, um obtido do soro de um paciente com quadro clínico comum e outro isolado do cérebro de um paciente com doença neurológica. Conforme os resultados, o ZIKV isolado do caso neurológico induziu

visualmente um maior dano na cultura de célula EA.hy926 e ativou caspase-1. Porém, para realizar inferências sobre esta diferença de efeitos se faz necessário o uso de ferramentas genéticas, como sequenciamento genômico e/ou genética reversa, para a identificação de possíveis mutações em regiões determinantes para a patogenicidade.

A modulação do inflamassoma possui uma importante repercussão na clínica de doenças inflamatórias. Nas doenças infecciosas virais, esta repercussão é mais fácil de ser observada quando a infecção resulta na cronicidade, como os vírus oncogênicos EBV, KSHV, HPV-16 e HPV-18, cujas observações *in vitro* e *in vivo* sugerem que a ativação dos receptores celulares e seus produtos são alvo potencial para o tratamento dos tumores (ANSARI et al., 2013; PONTILLO et al., 2016; ROY et al., 2016). O HBV (CHEN et al., 2018) é outro vírus cuja ativação de inflamassoma possui correlação com a clínica do paciente, pois os receptores indutores do inflamassoma estão mais expressos em pacientes que ainda não evoluíram para a fase crônica, sugerindo um perfil protetor de resposta. De maneira semelhante, a modulação do inflamassoma também fornece perspectivas terapêuticas promissoras para o HCV (BURDETTE et al., 2012) e o HIV (MAMIK et al., 2017). Assim, no contexto do ZIKV, uma vez entendido como a resposta imune inata responde à infecção, estratégias terapêuticas tendo como alvo o próprio vírus, a célula ou algum produto da via ativada podem ser analisados para o controle da infecção.

Por fim, foi demonstrado também que a viabilidade celular decrescia de maneira tempo-dependente de infecção pelo ZIKV, em uma redução de quase 50% em relação as células não infectadas no tempo de 48 horas pós-infecção. Em 24 horas pós-infecção, embora a diminuição de viabilidade já fosse detectada, inclusive apresentando significância para o ZIKV BeH818305, a morfologia celular geral observada via microscópio invertido estava preservada. A saúde mitocondrial está diretamente relacionada com os estímulos de sobrevivência da célula e com a respiração celular, e também possui função chave cada vez mais evidente com a ativação da imunidade inata e da imunidade mediada por células, de forma que distúrbios mitocondriais estão relacionados com falhas na resposta imune (JIN et al., 2017; MILLS; KELLY; O'NEILL, 2017). Dada a complexidade desta organela é difícil comentar como esses distúrbios poderiam interferir diretamente na formação do inflamassoma, ainda assim quanto mais evidenciadas e mais fortes forem estas associações, mais fácil ficará de caracterizar as vias bioquímicas/moleculares e de trazer luz à utilização da mitocôndria como alvo celular para estratégias imunoterapêuticas no âmbito de diversas doenças.

Este é um dos trabalhos pioneiros de investigação do inflamassoma em resposta a infecção pelo ZIKV em cultura de células endoteliais humanas através da detecção de um de seus componentes essenciais: caspase-1. Estudos conduzidos na interface ZIKV x tecidos placentários são essenciais para a elucidação da patogênese do vírus e sua síndrome associada. Estudos adicionais são necessários no sentido de detectar outros componentes e caracterização do(s) receptor(es) envolvido(s), bem como traçar o perfil imunológico de resposta.

6 CONCLUSÕES

- A célula EA.hy926 é suscetível ao ZIKV apresentando efeito citopático frente a infecção;
- O ZIKV BeH818305 apresentou níveis de ativação mais elevado de caspase-1 no período de 48 horas pós-infecção nas células EA.hy926, indicando ativação do inflamassoma;
- A célula EA.hy926 apresentou alterações na saúde mitocondrial durante a infecção experimental por ambos os isolados do ZIKV de maneira tempo-dependente de infecção.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, K.M.; LAHON, A.; SUETER, M. A.; ARYA, R. P.; SEFEROVIC, M. D.; VOGT, M. B.; HU, M.; STOSI, F.; MANCINI, M. A.; HARRIS, R. A.; KAHR, M.; EPPES, C.; RAC, M.; BELFORT, M. A.; PARK, C.S.; LACORAZZA, D. L.; RICO-HESSE, R. Primary Human Placental Trophoblasts are Permissive for Zika Virus (ZIKV) Replication. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 4, 2017.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. **Imunologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.
- AL-OBAIDI, M. M. J.; BAHADORAN, A.; HAR, L. S.; MUI, W. S.; RAJARAJESWARAN, J.; ZANDI, K.; MANIKAM, R.; SEKARAN, S. D. Japanese encephalitis virus disrupts blood-brain barrier and modulates apoptosis proteins in THBMEC cells. **Virus Res.**, v. 2, n. 3, p. 17-28, 2017.
- ALCENDOR, D. J. Zika Virus Infection of the Human Glomerular Cells: Implications for Viral Reservoirs and Renal Pathogenesis. **J Infect Dis.**, v. 216, n. 2, p. 162-171, 2017.
- AMARA, A.; MERCER, J. Viral apoptotic mimicry. **Nat Rev Microbiol.**, v. 13, n. 8, p. 461-469, 2015.
- ANFASA, F.; GOEIJENBIER, M.; WIDAGDO, W.; SIEGERS, J. Y.; MUMTAZ, N.; OKBA, N.; RIEL, D. V.; ROCKX, B.; KOOPMANS, M. P. G.; MEIJERS, J. C. M.; MARTINA, B. E. E. Zika Virus Infection Induces Elevation of Tissue Factor Production and Apoptosis on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Front Microbiol.**, v. 10, n. 817, 2019.
- ANSARI, M. A.; SINGH, V. V.; DUTTA, S.; VEETIL, M. V.; DUTTA, D.; CHIKOTI, L.; LU, J.; EVERLY, D.; CHANDRAN, B. Constitutive interferon-inducible protein 16-inflammasome activation during Epstein-Barr virus latency I, II, and III in B and epithelial cells. **J Virol.**, v. 87, n. 15, p. 8606-8623, 2013.
- ARAÚJO, T. V. B.; RODRIGUES, L. C.; XIMENES, R. A. A.; MIRANDA FILHO, D. B.; MONTARROYOS, U. R.; DE MELO, A. P. L.; VALONGUEIRO, S.; DE ALBUQUERQUE, M. F. P. M.; SOUZA, W. V.; BRAGA, C.; FILHO, S. P. B.; CORDEIRO, M. T.; VAZQUEZ, E.; DI CAVALCANTI SOUZA, D.; HENRIQUES, C. M. P.; BEZERRA, L. C. A.; DA SILVA CASTANHA, P. M.; DHALIA, R.; MARQUES-JÚNIOR, E. T. A.; MARTELLI, C. M. T. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **The Lancet**, v. 16, n. 12, p. 1356-1363, 2016.
- ARAÚJO, T. V. B.; XIMENES, R. A. A.; MIRANDA-FILHO, D. B.; SOUZA, W. V.; MONTARROYOS, U. R.; MELO, A. P. L.; VALONGUEIRO, S.; ALBUQUERQUE, M. F. P. M.; BRAGA, C.; FILHO, S. P. B.; CORDEIRO, M. T.; VAZQUEZ, E.; CRUZ, D. D. C. S.; HENRIQUES, C. M. P.; BEZERRA, L. C. A.; CASTANHA, P. M. D. S.; DHALIA, R.; MARQUES-JÚNIOR, E. T. A.; MARTELLI, C. M. T.; RODRIGUES, L. C. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. **Lancet Infect Dis.**, v. 18, n. 3, p. 328-336, 2017.
- BARR, K. L.; ANDERSON, B. D.; PRAKOSO, D.; LONG, M. T. Working with Zika and Usutu Viruses In Vitro. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, n. 8, 2016.

- BESNARD, M.; LASTÉRE, S.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V.M.; MUSSO, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro surveill.**, v. 19, n. 13, p. 8-11, 2014.
- BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nat Rev Microbiol.**, v. 7, n. 2, p. 99-109, 2009.
- BEST, S. M. The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. **J Virol.**, v. 91, n. 3, 2017.
- BHARUCHA, T.; BREUER, J. Review: A neglected Flavivirus: an update on Zika virus in 2016 and the future direction of research. **Neuropathol Appl Neurobiol.**, v. 42, n. 4, p. 317-325, 2016.
- BIRUNGI, G.; CHEN, S. M.; LOY, B. P.; NG, M. L.; LI, S. F. Metabolomics approach for investigation of effects of dengue virus infection using the EA.hy926 cell line. **J Proteome Res.**, v. 9, n. 12, p. 6523-6534, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 52, 2015. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 3, 2016a.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil até a semana epidemiológica 51/2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 1, 2016b.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 52, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 3, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 52, 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. 2, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 52 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 4, 2019.
- BRINTON, M. A. Replication cycle and molecular biology of the West Nile virus. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 13-53, 2014.
- BRYANT, C.; FITZGERALD, K. A. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. **Trends Cell Biol.**, v. 19, n. 9, p. 455-464, 2009.
- BURDETTE, D.; HASKETT, A.; PRESSER, L.; MCRAE, S.; IQBAL, J.; WARIS, G. Hepatitis C virus activates interleukin-1 β via caspase-1-inflammasome complex. **J Gen Virol.**, v. 93, n. 2, p. 235-246, 2012.
- BURDMANN, E. A. Flaviviruses and Kidney Diseases. **Adv Chronic Kidney Dis.**, v. 26, n. 3, p. 198-206, 2019.
- CACEDA, E. R.; KOCHER, T. Z. Application of Modified Shell Vial Culture Procedure for Arbovirus Detection. **PLoS One**, v. 2, n. 10, 2007.

- CALVET, G.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. S. O.; SAMPAIO, S. A.; DE FILIPPIS, I.; FABRI, A.; ARAUJO, E. S. M.; DE SEQUEIRA, P. C.; DE MONDONÇA, M. C. L.; DE OLIVEIRA, L.; TSCHOEKE, D. A.; SCHRAGO, C. G.; THOMPSON, F. L.; BRASIL, P.; DOS SANTOS, F. B.; NOGUEIRA, R. M. R.; TANURI, A.; DE FILIPPIS, A. M. B. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 653-660, 2016.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.
- CAO-LORMEAU, V. M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; ROBIN, E.; BERRY, A. L.; MALLET, H. P.; SALL, A. A.; MUSSO, D. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerg Infect Dis.**, v. 20, n. 6, p. 1085-6, 2014.
- CEDILLO-BARRÓN, L.; GARCÍA-CORDERO, J.; SHRIVASTAVA, G.; CARRILLO-HALFON, S.; LEÓN-JUÁREZ, M.; ARRIAGA J. B.; VALENZUELA, P. L.; CASTAÑEDA, B. G. The Role of Flaviviral Proteins in the Induction of Innate Immunity. **Subcell Biochem.**, v. 88, p. 407-442, 2018.
- CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Ann. Ver. Microbiol.**, v. 44, p. 639-88, 1990.
- CHAN, J. F.; YIP, C. C.; TSANG, J. O.; TEE, K. M.; CAI, J. P.; CHIK, K. K.; ZHU, Z.; CHAN, C. C.; CHOI, G. K.; SRIDHAR, S.; ZHANG, A. J.; LU, G.; CHIU, K.; LO, A. C.; TSAO, S. W.; KOK, K. H.; JIN, D. Y.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. **Emerg Microbes Infect.**, v. 5, 2016.
- CHEN, H.; HE, G.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; WU, S. Differential Activation of NLRP3, AIM2, and IFI16 Inflammasomes in Humans with Acute and Chronic Hepatitis B. **Viral Immunol.**, v. 31, n. 9, p. 636-645, 2018.
- CHEN, I. Y.; ICHINOHE, T. Response of host inflammasomes to viral infection. **Trends Microbiol.**, v. 23, n. 1, p. 55-63, 2015.
- CHEN, L. H.; WILSON, M. E. Update on non-vector transmission of dengue: relevant studies with Zika and other flaviviruses. **Trop Dis Travel Med Vaccines**, v. 2, n. 15, 2016.
- CHEN, S.; WU, Z.; WANG, M.; CHENG, A. Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. **Viruses**, v. 9, n. 7, 2017.
- CLARO, P. A. V.; BRALIC, R. I. A. Zika virus in a new world. **Rev Chil Pediatr**, v. 87, n. 2, p. 79-81, 2016.
- COLAVITA, F.; BORDONI, V.; CAGLIOTI, C.; BIAVA, M.; CASTILLETI, C.; BORDI, L.; QUARTU, S.; IANNETTA, M.; IPPOLITO, G.; AGRATI, C.; CAPOBIANCHI, M. R.; LALLE, E. ZIKV Infection Induces an Inflammatory Response but Fails to Activate Types I, II, and III IFN Response in Human PBMC. **Mediators Inflamm.**, v. 2018, n. 3, 2018.
- COOKSON, B. T.; BRENNAN, M. A. Pro-inflammatory Programmed Cell Death. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 3, p. 113-114, 2001.

COSTA, H. E. L.; GOUILLY, J.; MANSUY, JM.; CHEN, Q.; LEVY, C.; CARTRON, G.; VEAS, F.; AL-DACCAK, R.; IZOPET, J.; JABRANE-FERRATA, N. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. **Sci Rep.**, 2016.

DAEP, C. A.; MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; EUGENIN, E. A. Flaviviruses, an expanding threat in public health: focus on dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. **J Neurovirol.**, v. 20, n. 6, p. 539-560, 2014.

DANTHI, P. Viruses and the Diversity of Cell Death. **Annu Rev Virol.**, v. 3, n. 1; p. 533-553. 2016.

DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. **Annu Rev Immunol.**, v. 29, p. 707-735, 2011.

DENG, J.; YU, X. Q.; WANG, P. H. Inflammasome activation and Th17 responses. **Mol Immunol.**, v. 107, p. 142-164, 2019.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (i). isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.

DRIGGERS, R. W.; HO, C.; KORHONEN, E. M.; KUIVANEN, S.; JÄÄSKELÄINEN, A. J.; SMURA, T.; ROSENBERG, A.; HILL, A.; DEBIASI, R. L.; VEZINA, G.; TIMOFEEV, J.; RODRIGUEZ, F. J.; LEVANOV, L.; RAZAK, J.; IYENGAR, P.; HENNENFENT, A.; KENNEDY, R.; LANCIOTTI, R.; PLESSIS, A. D.; VAPALAHTI, O. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **N Engl J Med.**, v. 374, n. 22, p. 2142-2151, 2016.

DUFFY, M. R.; CHEN, T. H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M.; KOOL, J. L.; LANCIOTTI, R. S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M. HELZBAUER, S.; DUBRAY, C.; GUILLAUMOT, L.; GRIGGS, A.; BEL, M.; LAMBERT, A. J.; LAVEN, J., KOSOY, O.; PANELLA, A.; BIGGERSTAFF, B. J.; FISCHER, M.; HAYES, E. B. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med.**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.

ENFISSI, A.; CADRINGTON, J.; ROOSBLAD, J.; KAZANJI, M.; ROUSSET, D. Zika virus genome from Americas. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, 227-228, 2016.

FAIZAN, M. I.; ABDULLAH, M.; ALI, S.; NAQVI, I. H.; AHMED, A.; PARVEEN, S. Zika virus-induced microcephaly and its possible molecular mechanism. **Intervirology**, v. 59, n. 3, p. 152-158, 2016.

FARIA, N. R.; AZEVEDO, R. D. S. D. S.; KRAEMER, M. U. G.; SOUZA, R.; CUNHA, M. S.; HILL, S. C.; THÉZÉ, J.; BONSALE, M. B.; BOWDEN, T. A.; RISSANEN, I.; ROCCO, I. M.; NOGUEIRA, J. S.; MAEDA, A. Y.; VASAMI, F. G. D. S.; MACEDO, F. L. L.; SUZUKI, A.; RODRIGUES, S. G.; CRUZ, A. C. R.; NUNES, B. T.; MEDEIROS, D. B. A.; RODRIGUES, D. S. G.; QUEIROZ, A. L. N.; DA SILVA, E. V. P.; HENRIQUES, D. F.; DA ROSA, E. S. T.; DE OLIVEIRA, C. S.; MARTINS, L. C.; VASCONCELOS, H. B.; CASSEB, L. M. N.; SIMITH, D. B.; MESSINA, J. P.; ABADE, L.; LOURENÇO, J.; ALCANTARA, L. C. J.; DE LIMA, M. M.; GIOVANETTI, M.; HAY, S. I.; DE OLIVEIRA, R. S.; LEMOS, P. D. S.; DE OLIVEIRA, L. F.; DE LIMA, C. P. S.; DA SILVA, S. P.; DE VASCONCELOS, J. M.; FRANCO, L.; CARDOSO, J. F.; VIANEZ-JÚNIOR, J. L. D. S. G.; MIR, D.; BELLO, G.; DELARORRE, E.; KHAN, K.; CREATORE,

- M.; COELHO, G. E.; DE OLIVEIRA, W. K.; TESH, R.; PYBUS, O. G.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345-349, 2016.
- FIGUEIREDO, L. F. T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 13, p. 1643-1649, 2000.
- FIGUEIREDO, C. P.; BARROS-ARAGÃO, F. G. Q.; NERIS, R. L. S.; FROST, P. S.; SOARES, C.; SOUZA, I. N. O.; ZEIDLER, J. D.; ZAMBERLAN, D. C.; SOUSA, V. L.; SOUZA, A. S.; GUIMARÃES, A. L. A.; BELLIO, M.; SOUZA, J. M.; ALVES-LEON, S. V.; NEVES, G. A.; PAULA-NETO, H. A.; CASTRO, N. G.; FELICE, F. G.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; CLARKE, J. R.; POIAN, A. T.; FERREIRA, S. T. Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. **Nat Commun.**, v. 10, n. 1, 2019.
- FOY, B. D.; KOBYLINSKI, K. C.; CHILSON FOY, J. L.; BLITVICH, B. J.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; HADDOW, A. D.; LANCIOTTI, R. S.; TESH, R. B. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg Infect Dis.**, v. 17, n. 5, p. 880-882, 2011.
- GALLUZZI, L.; LÓPEZ-SOTO, A.; KUMAR, S.; KROEMER, G. Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. **Immunity**, v. 44, n. 2, p. 221-231, 2016.
- GARCIA, M.; WEHBE, M.; LÉVÊQUE, N.; BODET, C. Skin innate immune response to flaviviral infection. **Eur Cytokine Netw.**, v. 28, n. 2, p. 41-51 2017.
- GAUNT, M. W.; SALL, A. A.; DE LAMBALLERIE, X.; FALCONAR, A. K.; DZHIVANIAN, T. I. GOULD, E. A. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. **J Gen Virol.**, v. 82, p. 1867-1876, 2001.
- GORBALENYA, A. E.; KRUPOVIC, M.; SIDDELL, S.; VARSANI, A.; KUHN, J. H. ICTV taxonomic proposal 2017.006G. Riboviria: establishing a single taxon that comprises RNA viruses at the basal rank of virus taxonomy. (2018). Disponível em: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201853068. Acesso em 23 jan. 2018.
- HOTTZ, E. D.; LOPES, J. F.; FREITAS, C.; VALLS-DE-SOUZA, R.; OLIVEIRA, M. F.; BOZZA, M. T.; POIAN, A. T.; WEYRICH, A. S.; ZIMMERMAN, G. A.; BOZZA, F. A.; BOZZA, P. T. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. **Blood.**, v. 122, n. 20, p. 3405-3414, 2013.
- GRAM, A. M.; FRENKEL, J.; RESSING, M. E. Inflammasomes and viruses: cellular defence versus viral offence. **J Gen Virol.**, v. 93, p. 2063-2075, 2012.
- GRIGORIADIS, C.; TYMPA, A.; CREATSA, M.; BAKAS, P.; LIAPIS, A.; KONDI-PAFITI, A.; CREATSAS, G. Hofbauer cells morphology and density in placentas from normal and pathological gestations. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 35, n. 9, p. 407-412, 2013.
- GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. Novel Roles for Caspase-8 in IL-1 β and Inflammasome Regulation. **Am J Pathol.**, v. 185, n. 1, p. 17-25, 2015.
- GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN,

- M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C. YOKSAN, S. PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nat Ver Microbiol**, v. 8, p. 7-16, 2010.
- HADDOW, A. D.; SCHUH, A. J.; YASUDA, C. Y.; KASPER, M. R.; HEANG, V.; HUY, R.; GUZMAN, H.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 6, n, 2, 2012.
- HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerg Infect Dis.**, v. 16, n. 9, p. 1347–1350, 2009.
- HE, Y.; HARA, H.; NÚÑEZ, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. **Trends Biochem Sci.**, v. 41, n. 12, p. 1012-1021, 2016.
- HE, Z.; CHEN, J.; ZHU, X.; AN, S.; DONG, X.; YU, J.; ZHANG, S.; WU, Y.; LI, G.; ZHANG, Y.; WU, J.; LI, M. NLRP3 Inflammasome Activation Mediates Zika Virus-Associated Inflammation. **J Infect Dis.**, v. 217, n. 12, p. 1942-1951, 2018.
- HEYMANN, D. L.; HODGSON, A.; SALL, A. A.; FREEDMAN, D. O.; STAPLES, J. E.; ALTHABE, F.; BARUAH, K.; MAHMUD, G.; KANDUN, N.; VASCONCELOS, P. F. C.; BINO, S.; MENON, K. U. Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? **The Lancet**, v. 387, p. 719-721, 2016.
- HUANG, Y.-J. S.; HIGGS, S.; HORNE, K. M.; VANLANDINGHAM, D. L. Flavivirus-Mosquito Interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4703–4730, 2014.
- INYOON, S.; SUTTITHEPTUMRONG, A.; PATTANAKITSAKUL, S. N. Synergistic Effect of TNF- α and Dengue Virus Infection on Adhesion Molecule Reorganization in Human Endothelial Cells. **Jpn J Infect Dis.**, v. 70, n. 2, p. 186-191, 2017.
- JIN, H. S.; SUH, H. W.; KIM, S. J.; JO, E. K. Mitochondrial Control of Innate Immunity and Inflammation. **Immune Netw.**, v. 17, n. 2, p. 77-88, 2017.
- KAUSHIK, D. K.; GUPTA, M.; KUMAWAT, K. L.; BASU, A. NLRP3 inflammasome: key mediator of neuroinflammation in murine Japanese encephalitis. **PLoS One.**, v. 7, n. 2, 2012.
- KAYAGAKI, N.; WARMING, S.; LAMKANFI, M.; VANDE, L. W.; LOUIE, S.; DONG, J.; NEWTON, K.; QU, Y.; LIU, J.; HELDENS, S.; ZHANG, J.; LEE, W. P.; ROOSE-GIRMA, M.; DIXIT, V. M. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 117-121, 2011.
- KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.
- KLEMA, V. J.; PADMANABHAN, R.; CHOI, K. H. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. **Viruses**, v. 7, n. 8, p. 4640-4656, 2015.
- KRAUER, F.; RIESEN, M.; REVEIZ, L.; OLADAPO, O. T.; MARTÍNEZ-VEJA, R.; PORGO, T. V.; HAEFLIGER, A.; BROUTET, N. J.; LOW, N. Zika virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain-Barrésyndrome: systematic review. **PLOS Medicine**, v. 14, n. 1, 2017.
- KUMAR, A.; HOU, S.; AIRO, A. M.; LIMONTA, D.; MANCINELLI, V.; BRANTON, W.; POWER, C.; HOBMAN, T. C. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. **EMBO Rep.**, v. 17. n. 12, p. 1766-1775, 2016.

- LABUS, J.; HÄCKEL, S.; LUCKA, L.; DANKER, K. Interleukin-1 β induces an inflammatory response and the breakdown of the endothelial cell layer in an improved human THBMEC-based in vitro blood-brain barrier model. **J Neurosci Methods.**, v. 15, n. 228, p. 35-45, 2014.
- LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T. D. Nlrp3: an immune sensor of cellular stress and infection. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 42, n. 6, p. 792-795, 2010.
- LAURETI, M.; NARAYANAN, D.; RODRIGUEZ-ANDRES, J.; FAZAKERLEY, J. K.; KEDZIERSKI, L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. **Front Immunol.**, v. 9, n. 2180, 2018.
- LECHTENBERG, B. C.; MACE, P. D.; RIEDL, S. J. Structural mechanisms in NLR inflammasome signaling. **Curr Opin Struct Biol.**, v. 20, p. 17-25, 2014.
- LINDENBACH, B.D.; HIEL, H. J.; RICE, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Field BN, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, Knipe DM (Eds.). **Field's Virology**. 4th ed. Lippincott Williams; Wilkins: Philadelphia, p. 1101-1152.
- LIU, H.; LIAO, H.; LI, B.; TSAI, S.; HUNG, G.; LO, S. Comparative Genomics, Infectivity and Cytopathogenicity of American Isolates of Zika Virus that Developed Persistent Infections in Human Embryonic Kidney (HEK293) Cells. **Int J Mol Sci.**, v. 20, n. 12, 2019.
- LIU, T.; TANG, L.; TANG, H.; PU, J.; GONG, S.; FANG, D.; ZHANG, H.; LI, Y. P.; ZHU, X.; WANG, W.; WU, M.; LIAO, Y.; LI, C.; ZHOU, H.; HUANG, X. Zika Virus Infection Induces Acute Kidney Injury Through Activating NLRP3 Inflammasome Via Suppressing Bcl-2. **Front Immunol.**, v. 10, n. 1925, 2019b.
- LONG, X.; LI, Y.; QI, Y.; XU, J.; WANG, Z.; ZHANG, X.; ZHANG, D.; ZHANG, L.; HUANG, J. XAF1 contributes to dengue virus-induced apoptosis in vascular endothelial cells. **FASEB J.**, v. 27, n. 3, p. 1062-1073, 2013.
- LUPFER, C.; MALIK, A.; KANNEGANTIA, T. Inflammasome control of viral infection. **Curr Opin Virol.**, v. 12, p. 38-46, 2015.
- MAMIK, M. K.; HUI, E.; BRANTON, W. G.; MCKENZIE, B. A.; CHISHOLM, J.; COHEN, E. A.; POWER, C. HIV-1 Viral Protein R Activates NLRP3 Inflammasome in Microglia: implications for HIV-1 Associated Neuroinflammation. **J Neuroimmune Pharmacol.**, v. 12, n. 2, p. 233-248, 2017.
- MAN, S.; UBOGU, E. E.; WILLIAMS, K. A.; TUCKY, B.; CALLAHAN, M. K.; RANSOHOFF, R. M. Human Brain Microvascular Endothelial Cells and Umbilical Vein Endothelial Cells Differentially Facilitate Leukocyte Recruitment and Utilize Chemokines for T Cell Migration. **Clin Dev Immunol.**, v. 2008, 2008.
- MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol.**, v. 27, p. 229-265, 2009.
- MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 5, n. 4, 2013.

- MIAO, E. A.; RAJAN, J. V.; ADEREM, A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. **Immunol Rev.**, v. 243, n. 1, p. 206-214, 2011.
- MILLS, E. L.; KELLY, B.; O'NEILL, L. A. J. Mitochondria are the powerhouses of immunity. **Nat Immunol.**, v. 18, n. 5, p. 488-498, 2017.
- MING, G. L.; TANG, H.; SONG, H. Advances in Zika Virus Research: Stem Cell Models, Challenges, and Opportunities. **Cell Stem Cell.**, v. 19, n. 6, p. 690-702, 2016.
- MLADINICH, M. C.; SCHWEDES, J.; MACKOW, E. R. Zika Virus Persistently Infects and Is Basolaterally Released from Primary Human Brain Microvascular Endothelial Cells. **MBio.**, v. 8, n. 4, 2017.
- MLAKAR, J.; KORVA, M.; TUL, N.; POLJŠAK-PRIJATELJ, M.; MRAZ, J.; KOLENC, M.; RESMAN, R. K.; VESNAVER, V. T.; FABJAN, V. V.; VIZJAK, A.; PIŽEM, J.; PETROVEX, M.; AVŠIČ ŽUPANC, T. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med.**, v. 374, p. 951-958, 2016.
- MLERA, L.; MELIK, W.; BLOOM, M. E. The role of viral persistence in flavivirus biology. **Pathog Dis.**, v. 71, n. 2, p. 137–163, 2014.
- MOUREAU, G.; COOK, S.; LEMEY, P.; NOUGAIREDE, A.; FORRESTER, N. L.; KHASNATINOV, M.; CHARREL, R. N.; FIRTH, A. E.; GOULD, E. A.; DE LAMBALLERIE, X. New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences. **PLoS One**, v. 10, n. 2, 2015.
- MOTA, M. T.; TERZIAN, A. C.; SILVA, M. L.; ESTOFOLETE, C.; NOGUEIRA, M. L. Mosquito-transmitted viruses - the great Brazilian challenge. **Braz J Microbiol.**, v. 47, p. 38-50, 2016.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M.G. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. **Nat Rev Microbiol.**, v. 3, n. 1, p. 13-22, 2005.
- MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; NHAN, T.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V. M. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg Infect Dis.**, v. 21, n. 2, p. 359-361, 2015.
- MUSSO, D.; GUBLER, D.J. ZikaVirus. **Clin Microbiol Rev**, v. 29, p. 487-524, 2016.
- NAZMI, A.; DUTTA, K.; HAZRA, B.; BASU, A. Role of pattern recognition receptors in flavivirus infections. **Virus Res.**, v. 24, n. 185, p. 32-40, 2014.
- NETEA, M. G.; FERWERDA, G.; JONG, D. J.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; KRAMER, M.; NABER, T. H.; DRENTH, J. P.; GIRARDIN, S. E.; KULLBERG, B. J.; ADEMA, G. J.; VAN DER MEER, J. W. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. **J Immunol.**, v. 174, n. 10, p. 6518-6523, 2005.
- OPITZ, B.; HIPPENSTIEL, S.; EITEL, J.; SUTTORP, N. Extra- and intracellular innate immune recognition in endothelial cells. **Thromb Haemost.**, v. 98, n. 2, p. 319-326, 2007.
- PAGANI, I.; GHEZZI, S.; ULISSE, A.; RUBIO, A.; TURRINI, F.; GARAVAGLIA, E.; CASTILLETI, C.; IPPOLITO, G.; POLI, G.; BROCCOLI, V.; PANINA-BORDIGNON, P.; VICENZI, E. Human Endometrial Stromal Cells Are Highly Permissive To Productive Infection by Zika Virus. **Sci Rep.**, 2017.

- PENG, H.; LIU, B.; YVES, T. D.; HE, Y.; WANG, S.; TANG, H.; REN, H.; ZHAO, P. QI, Z.; QIN, Z. Zika Virus Induces Autophagy in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Viruses.**, v. 10, n. 5, 2018.
- PONTILLO, A.; BRICHER, P.; LEAL, V. N.; LIMA, S.; SOUZA, P. R.; CROVELLA, S. Role of inflammasome genetics in susceptibility to HPV infection and cervical cancer development. **J Med Virol.**, v. 88, n. 9, p. 1646-1651, 2016.
- PUERTA-GUARDO, H.; GLASNER, D. R.; ESPINOSA, D. A.; BIERING, S. B.; PATANA, M.; RATNASIRI, K.; WANG, C.; BEATTY, P. R.; HARRIS, E. Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. **Cell Rep.**, v. 26, n. 6, p. 1598-1613, 2019.
- OEHLER, E.; WATRIN, L.; LARRE, P.; LEPARC-GOFFART, I.; LASTERE, S.; VALOUR, F.; BAUDOUIN, L.; MALLET, H.; MUSSO, D.; GHAWCHE, F. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill.**, v. 19, n. 9, 2014.
- OLIVEIRA, L. G.; PERON, J. P. S. Viral receptors for flaviviruses: Not only gatekeepers. **J Leukoc Biol.**, 2019.
- OPDENBOSCH, N. V.; LAMKANFI, M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. **Immunity**, v. 50, n. 6, p. 1352-1364, 2019.
- PARDY, R. D.; VALBON, S. F.; RICHER, M. J. Running interference: Interplay between Zika virus and the host interferon response. **Cytokine**, v. 119 p. 7-15, 2019.
- PERERA, R; KUHN, R. J. Structural proteomics of Dengue virus. **Curr Opin Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 369-377, 2008.
- PERERA-LECOIN, M.; MEERTENS, L.; CARNEC, X.; AMARA, A. Flavivirus entry receptors: an update. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 69-88, 2014.
- QUARESMA, J. A. S. Organization of the Skin Immune System and Compartmentalized Immune Responses in Infectious Diseases. **Clin Microbiol Rev.**, v. 32, n. 4, 2019.
- QUICKE, K. N.; BOWEN, J. R.; JOHNSON, E. L.; MCDONALD, C. E.; MA, H.; O'NEAL, J. T.; RAJAKUMAR, A.; WRAMMERT, J.; RIMAWI, B. H.; PULENDRAN, B.; SCHINAZI, R. F.; CHAKRABORTY, R.; SUTHAR, M. S. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. **Cell Host Microbe.**, v. 20, n. 1, p. 83-90, 2016.
- RAMOS, H. J.; LANTERI, M. C.; BLAHNIK, G.; NEGASH, A.; SUTHAR, M. S.; BRASSIL, M. M.; SODHI, K.; TREUTING, P. M.; BUSCH, M. P.; NORRIS, P. J.; GALE, M. JR. IL-1 β signaling promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 11, 2012.
- RASMUSSEN, S. A.; JAMIESON, D. J.; HONEIN, M. A.; PETERSEN, L. R. Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. **N Engl J Med.**, v. 374, n. 20, p. 1981-1987, 2016.
- RATHINAM, V. A.; FITZGERALD, K. A. Inflammasomes and anti-viral immunity. **J Clin Immunol.**, v. 30, n. 5, p. 632-637, 2010.
- RIBEIRO, M. R.; MORELI, J. B.; MARQUES, R. E.; PAPA, M. P.; MEUREN, L. M.; RAHAL, P.; DE ARRUDA, L. B.; OLIANI, A. H.; OLIANI, D. C. M. V.; OLIANI, S. M.;

- NARAYANAN, A.; NOGUEIRA, M. L. Zika-virus-infected human full-term placental explants display pro-inflammatory responses and undergo apoptosis. **Arch Virol.**, v. 163, n. 10, p. 2687-2699, 2018.
- RICCIARDI-JORGE, T.; BORDIGNON, J.; KOISHI, A.; ZANLUCA, C.; MOSIMANN, A. L.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Development of a quantitative NS1-capture enzyme-linked immunosorbent assay for early detection of yellow fever virus infection. **Sci Rep.**, v. 7, n. 1, 2017.
- RICHARD, A. S.; SHIM, B. S.; KWON, Y. C.; ZHANG, R.; OTSUKA, Y.; SCHMITH, K.; BERRI, F.; DIAMOND, M. S.; CHOE, H. AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 8, p. 2024-2029, 2017.
- ROBBINS, A; COTRAN, C. **Patologia** - bases patológicas das doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- ROSENBERG, A. Z.; YU, W.; HILL, D. A.; REYES, C. A.; SCHWARTZ, D. A. Placental Pathology of Zika Virus: Viral Infection of the Placenta Induces Villous Stromal Macrophage (Hofbauer Cell) Proliferation and Hyperplasia. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 141, n. 1, p. 43-48, 2017.
- ROY, A.; DUTTA, D.; IQBAL, J.; PISANO, G.; GJYSHI, O.; ANSARI, M. A.; KUMAR, B.; CHANDRAN, B. Nuclear Innate Immune DNA Sensor IFI16 Is Degraded during Lytic Reactivation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV): Role of IFI16 in Maintenance of KSHV Latency. **J Virol.**, v. 90, n. 19, p. 8822-8841, 2016.
- SAEEDI, B. J.; GEISS, B. J. Regulation of Flavivirus RNA Synthesis and Capping. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 4, n. 6, p. 723-735, 2013.
- SCHIRMER, D. A.; KAWWASS, J. F. Epidemiology, Virology, and Pathogenesis of the Zika Virus: From Neglected Tropical Disease to a Focal Point of International Attention. **Semin Reprod Med.**, v. 34, n. 5, p. 261-265, 2016.
- SCHWARTZ, D. A. 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.**, v. 295, n. 6, p. 1361-1368, 2017.
- SELISKO, B.; WANG, C.; HARRIS, E.; CANARD, B. Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication. **Curr Opin Virol.**, v. 9, p. 74-83, 2014.
- SHERIDAN, M. A.; YUNUSOV, D.; BALARAMAN, V.; ALEXENKO, A. P.; YABE, S.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; SCHUST, D. J.; FRANZ, A. W.; SADOVSKY, Y.; EZASHI, T.; ROBERTS, R. M. Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 9, p. 1587-1596, 2017.
- SHRIVASTAVA, G.; LEÓN-JUÁREZ, M.; GARCÍA-CORDERO, J.; MEZA-SÁNCHEZ, D. E.; CEDILLO-BARRÓN, L. Inflammasomes and its importance in viral infections. **Immunol Res.**, v. 64, p. 1101-1117, 2016.
- SIMONI, M. K.; JURADO, K. A.; ABRAHAMS, V. M.; FIKRIG, E.; GULLER, S. Zika virus infection of Hofbauer cells. **Am J Reprod Immunol.**, v. 77, n. 2, 2017.
- SIMONIN, Y.; LOUSTALOT, F.; DESMETZ, C.; FOULONGNE, V.; CONSTANT, O.; FOURNIER-WIRTH, C.; LEON, F.; MOLÈS, J. P.; GOUBAUD, A.; LEMAITRE, J. M.;

- MAQUART, M.; LEPARC-GOFFART, I.; BRIANT, L.; NAGOT, N.; VAN DE PERRE, P.; SALINAS, S. Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. **EBioMedicine**, p. 161-169, 2016.
- SMIT, J. M.; MOESKER, B.; RODENHUIS-ZYBERT, I.; WILSCHUT, J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. **Viruses**, v. 3, n. 2, p. 160-171, 2011.
- SMITH, D.E.; BECKHAM, J. D.; TYLER, K. L.; PASTULA, D. M. Zika virus disease for neurologists. **Neurol Clin Pract.**, v. 6, n.6, p. 515–522, 2016.
- SMITHBURN, K. C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. **J Immunol.**, v. 69, n. 2, p. 223-234, 1952.
- SOUSA, J. R.; AZEVEDO, R. D. S. D. S.; MARTINS FILHO, A. J.; DE ARAUJO, M. T. F.; CRUZ, E. D. R. M.; VASCONCELOS, B. C. B.; CRUZ, A. C. R.; DE OLIVEIRA, C. S.; MARTINS, L. C.; VASCONCELOS, B. H. B.; CASSEB, L. M. N.; CHIANG, J. O.; QUARESMA, J. A. S.; VASCONCELOS, P. F. C. In situ inflammasome activation results in severe damage to the central nervous system in fatal Zika virus microcephaly cases. **Cytokine**, v. 111, p. 255-264, 2018.
- SOLLBERGER, G.; STRITTMATTER, G. E.; GARSTKIEWICZ, M.; SAND, J.; BEER, H. D. Caspase-1: the inflammasome and beyond. **Innate Immun.**, v. 20, n. 2, p. 115-125, 2014.
- TABATA, T.; PETITT, M.; PUERTA-GUARDO, H.; MICHELMAYR, D.; WANG, C.; FANG-HOOVER, J.; HARRIS, E.; PEREIRA, L. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell Host Microbe.**, v. 20, n. 2, p. 155-160, 2016.
- TANG, Z.; ABRAHAMS, V. M.; MOR, G.; GULLER, S. Placental Hofbauer cells and complications of pregnancy. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1221, p. 103-108, 2011.
- TING, J. P. Y; LOVERING, R. C.; ALNEMRI, E. S.; BERTIN, J.; BOSS, J. M.; DAVIS, B.; FLAVELL, R. A.; GIRARDIN, S. E.; GODZIK, A.; HARTON, J. A.; HOFFMAN, H. M.; HUGOT, J.; INOHARA, N.; MACKENZIE, A.; MALTAIS, L. J.; NUNEZ, G.; OGURA, Y.; OTTEN, L.; REED, J. C.; REITH, W.; SCHREIBER, S.; STEIMLE, V.; WARD, P. A. The NLR gene family: An official nomenclature. **Immunity**, v. 28, n. 3, p. 285–287, 2008.
- TRICARICO, P. M.; CARACCILO, I.; CROVELLA, S.; D'AGARO, P. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 492, n. 4, p. 597-602, 2017.
- TRIPATHI, S.; BALASUBRAMANIAM, V. R.; BROWN, J. A.; MENA, I.; GRANT, A.; BARDINA, S. V.; MARINGER, K.; SCHWARZ, M. C.; MAESTRE, A. M.; SOURISSEAU, M.; ALBRECHT, R. A.; KRAMMER, F.; EVANS, M. J.; FERNANDEZ-SESMA, A.; LIM, J. K.; GARCÍA-SASTRE, A. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. **PLoS Pathog.**, v. 13, n. 3, 2017.
- TSCHOPP, J.; MARTINON, F.; BURNS, K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 4, n. 2. P. 95-104, 2003.

- VALDERRAMA, A.; DÍAZ, Y.; LÓPEZ-VERGÈS, S. Interaction of Flavivirus with their mosquito vectors and their impact on the human health in the Americas. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 492, n. 4, p. 541-547, 2017.
- VICENZI, E.; PAGANI, I.; GHEZZI, S.; TAYLOR, S. L.; RUDD, T. R.; LIMA, M. A.; SKIDMORE, M. A.; YATES, E. A. Subverting the mechanisms of cell death: flavivirus manipulation of host cell responses to infection. **Biochem Soc Trans.**, v. 46, n. 3, p. 609-617, 2018.
- WANG, W.; LI, G.; DE, W. U.; LUO, Z.; PAN, P.; TIAN, M.; WANG, Y.; XIAO, F.; LI, A.; WU, K.; LIU, X.; RAO, L.; LIU, F.; LIU, Y.; WU, J. Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 β secretion. **Nat Commun.**, v. 9, n. 1, 2018.
- YE, J.; ZHU, B.; FU, Z. F.; CHEN, H.; CAO, S. Immune evasion strategies of flaviviruses. **Vaccine**, v. 31, n.3, p. 461-471, 2013.
- YE, Q.; LIU, Z. Y.; HAN, J. F.; JIANG, T.; LI, X. F.; QIN, C. F. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. **Infect Genet Evol.**, v. 43, p. 43-49, 2016.
- YIN, Q.; FU, T. M.; LI, J.; WU, H. Structural biology of innate immunity. **Annu Rev Immunol.**, v. 33, p. 393-416, 2015.
- YIN, Y.; PASTRANA, J. L.; LI, X.; HUANG, X.; MALLILANKARAMAN, K.; CHOI, E. T.; MADESH, M.; WANG, H.; YANG, X. F. **Front Biosci.**, n. 1, v. 18, p. 638-649, 2013.
- YUN, S. I.; LEE, Y. M. Zika virus: An emerging flavivirus. **J Microbiol.**, v. 55, n. 3, p. 204-209, 2017.
- ZHAOLIN, Z.; GUOHUA, L.; SHIYUAN, W.; ZUO, W. Role of pyroptosis in cardiovascular disease. **Cell Prolif.**, v. 52, n. 2, 2018.
- ZHOU, J. H.; WANG, Y. N.; CHANG, Q. Y.; MA, P.; HU, Y.; CAO, X. Type III Interferons in Viral Infection and Antiviral Immunity. **Cell Physiol Biochem**, v. 51, n. 1, p. 173-185, 2018.