



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

PAULO ALEX NEVES DA SILVA

**Avaliação da produção de citocinas, quimiocinas e fatores de
crescimento nas fases aguda e convalescente da infecção pelo vírus
Zika em área endêmica**

**Goiânia
2017**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE
TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Paulo Alex Neves da Silva

Título do trabalho: Avaliação da produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nas fases aguda e convalescente da infecção pelo vírus Zika em área endêmica

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

PAULO ALEX NEVES DA SILVA
Assinatura do (a) autor (a)²

Ciente e de acordo:

Simone Gonals do Loure
Assinatura do (a) orientador(a)²

Data: 6 / 2 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

PAULO ALEX NEVES DA SILVA

Avaliação da produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nas fases aguda e convalescente da infecção pelo vírus Zika em área endêmica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof.^a Dr.^a Simone Gonçalves da Fonseca

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Alex Neves da Silva, Paulo

Avaliação da produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nas fases aguda e convalescente da infecção pelo vírus Zika em área endêmica [manuscrito] / Paulo Alex Neves da Silva. - 2017.

XV, 90 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Simone Gonçalves da Fonseca .

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Vírus Zika. 2. Inflamação. 3. Citocinas. I. , Simone Gonçalves da Fonseca, orient. II. Título.

CDU 612.017



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE PAULO ALEX NEVES DA SILVA - Aos cinco dias do mês de dezembro do ano de 2017 (05/12/2017), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. SIMONE GONÇALVES DA FONSECA, MARA RÚBIA NUNES CELES e MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO NAS FASES AGUDA E CONVALESCENTE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA EM ÁREA ENDÊMICA”**, em nível de MESTRADO, de autoria de PAULO ALEX NEVES DA SILVA, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. SIMONE GONÇALVES DA FONSECA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca

Profa. Dra. Mara Rúbia Nunes Celes

Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Aprovado / Reprovado

APROVADO

APROVADO

APROVADO

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato HABILITADO (**Habilitado** ou **não Habilitado**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 15h10 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor. A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Mara Rúbia Nunes Celes (IPTSP/UFG)

Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira (IPTSP/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

Simone G. Fonseca
Mara Rúbia Nunes Celes
Milton Adriano Pelli de Oliveira

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Paulo Alex Neves da Silva

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a. Simone Gonçalves da Fonseca

Membros:

- 1. Prof.^a Dr.^a. Simone Gonçalves da Fonseca**
- 2. Prof.^a. Dr.^a. Menira Borges de Lima Dias e Souza**
- 3. Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira**

Data: 05/12/2017

AGRADECIMENTOS

À minha família, mãe, padrasto, irmãos, avó de quem me ausentei para a realização desse trabalho, minhas sinceras desculpas.

Aos amigos que venho juntando desde a infância, ensino fundamental, médio, graduação e pós-graduação.

À Prof.^a Simone por ter me acolhido em seu laboratório sem ao menos me conhecer e me ensinar sobre ciência. Compartilhou um pouco do seu conhecimento comigo.

Aos colegas do laboratório por terem me recebidos de braços abertos e me ajudado sempre que necessário.

A Prof.^a Araci Pfrimer por ter me acolhido em seu laboratório quando era preciso. Sua ajuda foi fundamental na realização desse trabalho juntamente com a Prof.^a Simone.

A Prof.^a Patrícia Nagib pela ajuda nas revisões do artigo e pelos mimos entregues no laboratório em datas comemorativas.

Ao programa de biologia da relação parasito-hospedeiro que me deu a oportunidade de ingressar na UFG.

A todos os profissionais que participaram direta ou indiretamente na minha pesquisa.

A todos os professores no qual tive o prazer de ter aulas durante a realização do mestrado.

Aos professores Milton Oliveira, Mara Rubia Celes e Fabíola Fiaccadori que participaram do meu exame de qualificação, suas arguições me fizeram crescer muito.

E por fim, e não menos importante, a todos os professores que fizeram parte da minha vida, desde o ensino pré-escolar até a pós-graduação.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	VII
LISTA DE ABREVIATURA	XII
LISTA DE SÍMBOLOS	XII
LISTA DE TABELA	X
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	01
1.1. Biologia do vírus Zika	01
1.2. Genoma viral e replicação vírus	01
1.3. Epidemiologia do vírus	02
1.4. Transmissão do vírus.....	03
1.4.1. Do vetor ao homem	03
1.4.2. Vias alternativas de transmissão	03
1.5. Sintomatologia e diagnóstico laboratorial e molecular.....	05
1.6. Alterações neurológicas e oftalmológicas	06
1.7. Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.....	07
1.8. Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento na infecção pelo ZIKV	09
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVO GERAL	12
3.1. Objetivos específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1. Local e população de estudo	13
4.2. Considerações éticas	13
4.3. Critérios de inclusão	13

4.4. Critérios de exclusão	13
4.5. Amostras de sangue	14
4.6. Quantificação dos mediadores pelo método Luminex	14
4.7. Extração de RNA viral	16
4.8. PCR em tempo real para o vírus Zika	17
4.9. Análises estatísticas	17
4.10 Desenho experimental	18
5 RESULTADOS	19
5.1. Características dos indivíduos do estudo	19
5.2. Níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias, IFN- γ e TNF- α durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV.....	22
5.3. Níveis plasmáticos de quimiocinas durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV.....	23
5.4. Níveis plasmáticos de fatores de crescimento durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV	25
5.5. Comparação dos níveis plasmáticos de citocinas nas fases aguda e de convalescença	27
5.6. Comparação dos níveis plasmáticos de quimiocinas nas fases aguda e de convalescença	27
5.7. Comparação dos níveis plasmáticos de fatores de crescimento nas fases aguda e de convalescença	29
5.8. Associação entre os níveis plasmáticos de citocinas com o número de sintomas	31
5.9. Associação entre os níveis plasmáticos de quimiocinas com o número de sintomas	31

5.10. Associação entre os níveis plasmáticos de fatores de crescimento com o número de sintomas	32
5.11. Níveis plasmáticos de quimiocinas em dias após surgimento de sintomas	34
5.12. Associação dos níveis plasmáticos de citocinas e carga viral	35
5.13. Associação dos níveis plasmáticos de quimiocinas e carga viral	35
5.14 Associação dos níveis plasmáticos de fatores de crescimento e carga viral	37
6 DISCUSSÃO.....	39
7 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	46

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Tabela 1. Limite de detecção das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento	15
Tabela 2. Características demográficas dos pacientes com ZIKV e doadores saudáveis	19
Tabela 3. Características dos indivíduos infectados pelo ZIKV	20
Tabela 4. Principais manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos infectados pelo ZIKV	21
Tabela 5. Valores de CT do PC em tempo real para ZIKV nos indivíduos ZIKV+	21
Figura 1. Níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias, de IFN- γ e TNF- α , durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV e dos indivíduos controles	23
Figura 2. Níveis plasmáticos de quimiocinas durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV	24
Figura 3. Níveis plasmáticos de fatores de crescimento durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV.....	26
Figura 4. Comparação dos níveis plasmáticos de citocinas nas fases aguda e de convalescença	27
Figura 5. Comparação dos níveis plasmáticos de quimiocinas nas fases aguda e de convalescença.....	28
Figura 6. Comparação dos níveis plasmáticos de fatores de crescimento nas fases aguda e de convalescença	30

Figura 7. Associação entre os níveis plasmáticos de citocinas com o número de sintomas	31
Figura 8. Associação entre os níveis plasmáticos de quimiocinas com o número de sintomas	32
Figura 9. Associação entre os níveis plasmáticos de fatores de crescimento com o número de sintomas	33
Figura 10. Níveis plasmáticos de quimiocinas em diferentes dias após surgimento de sintomas	34
Figura 11. Associação dos níveis de citocinas e carga viral	35
Figura 12. Associação dos níveis plasmáticos de quimiocinas e carga viral	36
Figura 13. Associação dos níveis plasmáticos de fatores de crescimento e carga viral	38
Anexo	57
Termo de Consentimento Livre e esclarecido.....	57
Ficha de investigação	60
Parecer do comitê de ética	61
Apêndice: Artigo publicado em versão inglesa	62

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

C	Cisteína
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
G-CSF	Fator estimulador de colônia de Granulócito
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito-monócito
IL-	Interleucina
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon-gama
IFN- γ	Interferon-gama
KDa	Kilodalton
MPC-1	Proteína quimioatrativa de monócito 1
MIP-1 α	Proteína inflamatória derivada de macrófago 1 α
MIP-1 β	Proteína inflamatória derivada de macrófago 1 β
N/I	Não informado
NS	Não estrutural
PF-4	Fator de plaqueta 4
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
RANTES	Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia pela polimerase em tempo real
TNF	Fator de necrose tumoral

VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
ZIKV	Vírus Zika

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é transmitido pela picada do mosquito, principalmente do gênero *Aedes*. O vírus foi isolado pela primeira vez em primatas não humanos, na floresta Zika em Uganda em 1947. Entre 1953 a 2006, houve casos esporádicos de infecção pelo ZIKV em humanos na África, Ásia e Oceania, sendo considerada benigna. Em 2007, ocorreu o primeiro surto do ZIKV e a partir desse período, começou a surgir complicações tais como: microcefalia e síndrome de Guillain-Barré. Aproximadamente 80% dos casos da infecção pelo ZIKV são assintomáticos, porém, quando os sintomas ocorrem são tipicamente brandos e não específicos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil plasmático de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento durante a infecção por ZIKV nas fases aguda e convalescente. Poucos mediadores imunes apresentaram níveis significativamente mais elevados na fase aguda, IFN- γ , IP-10 e RANTES quando comparados aos doadores saudáveis. Além disso, os níveis de IP-10 plasmáticos também foram significativamente mais elevados na fase aguda da infecção quando comparados à fase convalescente. Não foram observadas associações entre os níveis das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento avaliados e o número de sintomas ou viremia. Em conjunto, nossos dados indicam que a infecção na fase aguda pelo vírus Zika em áreas endêmicas é capaz de estimular o sistema imune de forma sutil e com perfil acentuadamente pró-inflamatório, podendo não ser capaz de eliminar a infecção viral eficientemente, colaborando para a imuno-patogênese da infecção e favorecendo a disseminação viral.

Palavras-chaves: Vírus Zika; Inflamação; Citocinas.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is transmitted by the bite of the mosquito, mainly of the genus *Aedes*. The virus was first isolated in nonhuman primates in Zika forest in Uganda in 1947. Between 1953-2006, there were sporadic cases of ZIKV infection in humans in Africa, Asia and Oceania, and it was considered benign. In 2007, there was the first outbreak of the ZIKV and from that time, began to emerge complications such as microcephaly and Guillain-Barre syndrome. Approximately 80% of ZIKV infection cases are asymptomatic, but when symptoms do occur are usually mild and nonspecific. The objective of this study was to evaluate plasma levels of cytokines, chemokines and growth factors for infection ZIKV in acute and convalescent phases. Few immune mediators had significantly higher levels in the acute phase, namely IFN- γ , IP-10 and RANTES when compared to healthy donors. In addition, plasma levels of IP-10 were also significantly higher in the acute phase of infection when compared to the convalescent phase. No associations were observed between cytokine, chemokines and growth factor levels that were evaluated, and the number of symptoms or viremia. Together, our data indicate that the Zika virus infection during acute phase, in endemic areas, is able to stimulate the immune system in a subtle way and with a markedly pro-inflammatory profile, and it may not be able to eliminate the viral infection efficiently, collaborating for the immunopathogenesis of the infection and favoring viral dissemination.

Keywords: Zika virus; Inflammation; Cytokine.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Biologia do vírus Zika

O vírus Zika (ZIKV) pertence à família flaviviridae, gênero *Flavivirus*. O gênero *Flavivirus* é composto por mais de 70 espécies de vírus, incluindo o vírus dengue, vírus febre amarela, vírus encefalite japonesa e vírus Nilo Oeste (Araújo et al., 2016). O ZIKV é transmitido principalmente pela picada do mosquito fêmea do gênero *Aedes*. O vírus foi isolado pela primeira vez em primatas não humanos, macacos *Rhesus* sentinela, na floresta Zika em Uganda em 1947. Por esse motivo, a denominação do vírus como Zika (Cugola et al., 2016).

Análises filogenéticas de isolados de ZIKV de Camboja, Malásia, Nigéria, Uganda e Senegal, mostram o sequenciamento do ZIKV, sugere que existam duas linhagens principais de ZIKV, a asiática e a africana. O surto na ilha de Yap, localizado na Micronésia, por exemplo, foi causado pela linhagem originária do sudeste da Ásia e isso foi comprovado através da técnica reação em cadeia pela polimerase (PCR) (Revisado por Rabaan et al., 2016).

1.2. Genoma viral e replicação do vírus

O RNA viral é constituído por uma única molécula linear de sentido positivo com cerca de 10.794 pares de bases (Giovanetti et al., 2016). O genoma apresenta uma única ORF (do inglês *open read frame*) flanqueada por regiões não codificantes (3' e 5'). A tradução da ORF codifica para uma única poliproteína que sofre clivagens por proteases virais e celulares dando origem as proteínas estruturais (cada proteína constituirá o capsídeo, a pré-membrana e envelope) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B e NS5) do vírus (Faria et al., 2016; Focosi et al., 2016). As proteínas do envelope de *flavivirus* mediam a fusão do vírus com as células-alvo e é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes do hospedeiro, enquanto que as proteínas não estruturais (NS) são secretadas por células infectadas e estão envolvidas na evasão imune e patogênese (Stettler et al., 2016). Essas proteínas não estruturais têm sido foco de diversos estudos a fim de identificar suas funções biológicas (Luo D, Vasudevan SG, Lescar J. 2015). Por exemplo, a proteína NS1 tem a capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro, contribuindo para diversas estratégias de evasão pelo vírus (Edeling MA, Diamond MS, Fremont DH. 2014; Akey et al., 2014). As proteínas NS2B,

NS4A e NS4B são conhecidas por inibir a produção de interferons por células hospedeiras (Liu et al., 2016; Leung et al., 2008).

Assim como outros flavivirus, o vírus Zika possui duas regiões não traduzíveis chamadas de 5' com 107 nucleotídeos e 3' com 429 nucleotídeos. Essa última não possui uma cauda de poliadenilato e contém uma estrutura conservada que provavelmente possui diferentes funções durante a replicação nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (Villordo et al., 2016).

A replicação viral ocorre no citoplasma das células infectadas. O vírus induz alterações tanto na estrutura celular quanto nas vias metabólicas celulares para promover a replicação viral (Medin, 2016). Inicialmente ocorre a endocitose viral que pode ser via receptor TIM, TAM, AXL e TYRO3 (Dang et al., 2016; Barzon et al., 2016), posteriormente ocorre a fusão com a membrana endossômica da célula do hospedeiro, levando ao desnudamento da partícula viral e posterior tradução do genoma viral em uma única poliproteína no retículo endoplasmático. A poliproteína é processada pela protease NS2B-NS3 viral e proteases celulares para a produção das proteínas virais, ao final desse processo, a partícula viral é liberada (Barzon et al., 2016).

1.3. Epidemiologia do vírus

Até o ano de 2006, apenas casos esporádicos de infecção em humanos foram associados ao ZIKV nas regiões próximas de florestas no continente africano (Duffy et al., 2009).

Em 2007, foi notificado o primeiro surto de ZIKV, localizado nas ilhas Yap, na Micronésia (Araújo et al., 2016). Aproximadamente 73% da população local foram infectadas (Aguilar-León et al., 2016). Posteriormente ocorreram surtos no sudeste da Ásia e ao longo das ilhas do Oceano Pacífico (Ioos et al., 2014).

De 2013 a 2015, a linhagem asiática alcançou o Brasil e, posteriormente, disseminou-se pela América do Sul e América Central (Cugola et al., 2016). O primeiro caso de infecção pelo ZIKV confirmado no Brasil foi em maio de 2015, porém, análises filogenéticas sugerem que a introdução do ZIKV nas Américas ocorreu entre maio e dezembro de 2013, pelo menos doze meses antes do primeiro caso confirmado no Brasil (Faria et al., 2016). Essa estimativa coincide com o aumento de turistas vindos de avião ao Brasil de áreas consideradas endêmicas (Faria et al., 2016).

Desde sua introdução no Brasil, o ZIKV rapidamente se espalhou por todo o território nacional, com estimativas preliminares de 440.000 a 1,3 milhões de pessoas infectadas até dezembro de 2015 e casos autóctones de infecção foram detectados em 26 países nas Américas (Bayer et al., 2016; Moreira et al., 2016). Em virtude dessa rápida disseminação e gravidade da doença, a Organização Mundial de Saúde (OMS) em fevereiro de 2016 decretou o surto como uma emergência de saúde pública de âmbito internacional, contudo, em novembro do mesmo ano, a OMS considerou que o vírus Zika e a microcefalia não eram mais emergência de saúde internacional (WHO 2016).

1.4. Transmissão do vírus

1.4.1. Do vetor ao homem

O ZIKV é uma arbovirose caracterizada pela transmissão pela fêmea do mosquito vetor, sendo a principal forma de transmissão do vírus, conhecida como transmissão vetorial (Petersen et al., 2016). O mosquito se infecta com o vírus durante o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado o qual tem a capacidade de se replicar e usar o mosquito-vetor como ‘amplificador’, no próximo repasto sanguíneo, o mosquito infectado poderá transmitir o vírus para o homem ou outro animal, inoculando-os na pele (Ioos et al., 2014). O ZIKV circula no ciclo silvestre e urbano, sendo este último melhor descrito. As espécies *A. aegypti* e *A. albopictus* são as principais espécies envolvidas na manutenção do ciclo do ZIKV no ambiente urbano e silvestre, respectivamente. A transmissão do ZIKV por diversas espécies de mosquitos do gênero *Aedes* e outros mosquitos, abrem a possibilidade de disseminação do vírus onde o mosquito pode estar presente, incluindo o sul da Europa e dos Estados Unidos da América (Revisado por Rabaan et al., 2016).

1.4.2 Vias alternativas de transmissão

Além da via vetorial, existem outras vias de transmissão não vetoriais sendo avaliadas e sugeridas, como a via sexual, transfusão sanguínea e transmissão congênita (Petersen et al., 2016).

Um trabalho realizado por García-Bujalance e colaboradores, detectou RNA viral, após três meses do início dos sintomas, em sêmen de dois indivíduos que retornaram de áreas endêmicas (García-Bujalance et al., 2017). Outros trabalhos suportam a hipótese de que o vírus possui a capacidade em permanecer (persistência viral) em líquidos espermáticos humanos após a resolução da infecção (revisado por Salam & Horby,

2017). Em ratos, também foi observado a capacidade do vírus em permanecer no trato genital feminino e líquidos seminais de ratos machos após a infecção (McDonald et al., 2017).

Em seu estudo Musso et al. (2015) encontraram achados laboratoriais que propiciaram um maior suporte para a comprovação da transmissão sexual. Durante a epidemia de ZIKV na Polinésia Francesa, um paciente no Taiti apresentou hematospermia e uma alta carga viral com partículas replicativas do ZIKV isoladas em seu sêmen, o que sugere a replicação do vírus no trato genital masculino.

Além desses relatos de caso, um estudo em macacos *Rhesus* detectou a presença do ZIKV em fluidos vaginais após a inoculação do vírus por via subcutânea (DUDLEY, 2016) e Prisant et al. (2016) encontraram o RNA do ZIKV por PCR em Tempo Real no muco cervical de uma mulher infectada após três dias de manifestações clínicas da doença.

Em relação à transfusão sanguínea, os casos assintomáticos da infecção são considerados agravantes, por não ter certeza se essa seria uma possível via de transmissão. No Brasil, um caso de transmissão por transfusão sanguínea ocorreu no hemocentro da Universidade Estadual de Campinas no ano de 2015 (Zorzetto, 2016). Devido a esses eventos, foram estabelecidas recomendações e guias a fim de evitar novas ocorrências (OMS, 2015). Em seu estudo, Musso e colaboradores, avaliaram 1.505 doadores de sangue, apesar de assintomáticos no período de doação sanguínea, observou-se que 42 doadores (3%) tiveram seus resultados positivos para ZIKV confirmados pela técnica de PCR em tempo real (Musso et al., 2014).

A transmissão congênita reflete a preocupação com problemas relacionados ao feto. Diversos estudos relacionaram a microcefalia com a capacidade do ZIKV de atravessar a barreira placentária em qualquer trimestre da gravidez, principalmente no primeiro trimestre (Petersen et al., 2016; Cugola et al., 2016). Mlakar et al. (2016) descreveram um relato de caso de uma gestante com histórico de infecção pelo ZIKV durante sua estadia no Brasil. Com 29 semanas de gestação uma ultrassonografia revelou que o feto apresentava microcefalia e calcificações cerebrais. O feto foi abortado cirurgicamente e legalmente em seu país de origem, sendo detectada a presença do ZIKV no tecido cerebral fetal, mas não foi encontrado em qualquer outro órgão ou tecido, comprovando o forte tropismo pelas células cerebrais. Fêmeas de camundongos grávidas foram infectadas com a cepa brasileira de ZIKV (ZIKVBR), o estudo evidenciou que os

filhotes das grávidas que apresentaram a infecção possuíam um claro indício de atraso no desenvolvimento corporal, e um ensaio de qPCR demonstrou a presença de RNA viral em vários tecidos desses recém-nascidos, com prevalência significativa no cérebro, confirmando o neurotropismo viral e agressividade da cepa brasileira. Além disso, os resultados indicam que o ZIKVBR é capaz de atingir as células progenitoras corticais, induzindo a morte celular por apoptose e autofagia (CUGOLA *et al.*, 2016). O ZIKV é capaz de infectar células progenitoras do córtex neural, ocasionando problemas transcricionais e um retardo no crescimento celular (TANG *et al.*, 2016). Além das alterações congênicas, há outras manifestações neurológicas citadas em outros trabalhos, incluindo mielites aguda e meningoencefalite (Araújo *et al.*, 2016).

1.5. Sintomatologia e diagnóstico laboratorial e molecular

Os sintomas associados com o ZIKV são bem variados. Aproximadamente 80% dos casos são assintomáticos. Porém, quando os sintomas ocorrem, são tipicamente brandos e inespecíficos. Isso inclui febre branda, conjuntivite não purulenta, erupção cutânea, artralgia com predomínio nos pés e mãos (Aguilar-León *et al.*, 2016).

Outros vírus, por exemplo, o vírus Dengue, vírus Chikungunya e vírus Nilo Oeste também causam sintomas clínicos similares aos do ZIKV, dificultando, por exemplo, o diagnóstico da doença. O diagnóstico laboratorial específico da doença é importante para confirmar a infecção e seu agente patogênico, além de verificar se está havendo co-circulação de outros vírus (Araújo *et al.*, 2016).

Quando sintomáticos, existem testes moleculares considerados padrão-ouro para detecção do vírus Zika, tal como RT-PCR (reação em cadeia pela polimerase em tempo real) (CDC, 2017).

Outra possibilidade diagnóstica é através de técnicas como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para detecção de anticorpos ou outros componentes específicos contra o ZIKV. Assim como observado no trabalho realizado por Lee e Zeng, onde realizaram ELISA específica para detecção de epítomos da proteína NS1 do ZIKV (Lee & Zeng, 2017), contudo, técnicas sorológicas têm suas limitações, dentre elas, a reatividade cruzada com outros flavivírus, tal como dengue (Safronetz *et al.*, 2017).

Outra forma de diagnóstico é por parâmetros laboratoriais (quando não há a possibilidade de realização de testes moleculares e ELISA) que indicam a infecção ser

pelo ZIKV, como a diminuição dos leucócitos (leucopenia), diminuição das plaquetas (trombocitopenia), níveis aumentados no soro de desidrogenase láctica (LDH), Transferase gama-glutamil-1 (GGT), além de marcadores de inflamação, incluindo, proteína C reativa, fibrinogênio e ferritina (Dasti, 2016). Contudo, dentre todas as formas diagnósticas, essa última é a menos realizada devido a sua alta inespecificidade.

1.6. Alterações neurológicas e oftalmológicas

Durante o surto na América Latina em 2016, a infecção pelo ZIKV foi associada ao desenvolvimento de diversas anormalidades fetais, que incluem abortos espontâneos, natimorto, hidrocefalia, microcefalia e insuficiência placentária que pode causar a restrição no crescimento intrauterino (Araújo et al, 2016; Lazear et al., 2016).

No Brasil, as desordens neurológicas foram associadas à infecção pelo ZIKV devido ao aumento significativo destas a partir de julho de 2015 (Araújo et al., 2016). A média de casos de microcefalias era de 163 casos no período de 2001 a 2014; no entanto, no dia 30 de janeiro de 2016 já eram 4.783 casos de microcefalia e/ou má formação no sistema nervoso central (Araújo et al., 2016).

, A infecção em mulheres grávidas é extremamente perigosa, pois o vírus tem a capacidade de atravessar a placenta e infectar o feto levando ao desenvolvimento de desordens neurológicas como a microcefalia (Morris et al., 2017). A microcefalia é uma condição rara no qual a circunferência da cabeça do bebê é menor ou igual a 32cm, originando a má formação congênita (Revisado por Rabaan et al., 2016). Quando em adultos, a infecção pelo ZIKV pode levar a alterações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB). A SGB é uma neuropatia periférica autoimune pós-infecção que pode produzir dor, fraqueza e paralisia. Usualmente essa condição é temporária, porém, SGB pode induzir a paralisia respiratória, sendo fatal ao indivíduo quando não assistido adequadamente (Lazear et al., 2016).

No início de 2016 foram relatados casos de anomalias oftalmológicas em crianças com microcefalia no Brasil, sendo estas, associadas à infecção por ZIKV. Dentre as alterações constatadas estavam, calcificação intracerebral com mancha pigmentar unilateral da macula e baixo reflexo foveal, atrofia macular, mancha pigmentar focal da

retina, atrofia corioretinal, anormalidades no nervo ótico, subluxação do cristalino e colobomas na íris unilateral (Valentine et al., 2016).

1.7. Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento

As citocinas constituem um grupo de proteínas que possuem a capacidade funcional diversificada e possui uma variação em seu tamanho (8-40 kDa). Essas proteínas são sintetizadas por células nucleadas e atuam de forma autócrina ou parácrina (Revisado por Cyster, 1999).

Existe um grupo de citocinas com baixo peso molecular (8-12 kDa) chamada de quimiocinas, essas têm a função de atrair e ativar leucócitos. Outra forma de classificar as citocinas é baseada em suas funções, de acordo com as funções desempenhadas, elas podem ser chamadas de citocinas pró-inflamatória ou anti-inflamatória (revisado por Zheng et al., 2016). As quimiocinas participam na recirculação de leucócitos entre tecidos e órgãos linfóides e/ou no tráfego deles no compartilhamento do linfonodo e timo (Revisado por Cyster, 1999).

Para ocorrer a eliminação de um agente patogênico após uma infecção, incluindo vírus, é necessário o recrutamento e ativação dos leucócitos para o local infectado (Melchjorsen et al., 2003). As quimiocinas são responsáveis pelo recrutamento dessas células imune e, posterior, ativação no local da infecção e/ou inflamação (Fahey et al., 2014; Revisado por kang & Shin, 2011). Essa migração ocorre devido à ligação de quimiocinas aos seus receptores específicos acoplados à proteína G, que contém sete domínios transmembrana e, são seletivamente expressos em diferentes células alvos (Revisado por kang & Shin, 2011). Após a interação da quimiocina e seu receptor, inicia a via de sinalização que culminará na polarização, migração e extravasamento de leucócitos (diapedese) do vaso sanguíneo para o tecido (Fahey et al., 2014).

Até o presente momento, são conhecidos aproximadamente 50 diferentes quimiocinas e 20 receptores. As quimiocinas possuem entre 80-120 resíduos de aminoácidos (Melchjorsen et al., 2003), essas, são divididas em quatro subfamílias, CC, CXC, CX3C e XC, onde X é um aminoácido e C é uma cisteína. Por exemplo, na subfamília CXC um aminoácido separa a primeira e terceira cisteína, enquanto na subfamília CC os primeiros dois resíduos de cisteína são adjacentes um ao outro. Cada

subfamília possui seu próprio receptor e consequentemente funções diferenciadas (Baggiolini et al., 1997).

Muitas quimiocinas exercem funções redundantes, a fim de evitar transtornos na hora da nomeação das citocinas, as quimiocinas passaram por uma nomenclatura sistemática lógica. Onde cada receptor é nomeado de acordo com a subfamília de quimiocinas no qual representa, por exemplo, as subfamílias CC e CXC, acrescenta-se a letra R designando 'receptor' e um número (esse número é baseado na ordem cronológica da identificação). Então, os receptores ficaram assim representados CCR e CXCR respectivamente (Thorpe, 2002).

Desde a descoberta das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, diversos estudos vem demonstrando suas funções sobre diferentes tipos de leucócitos e outros tipos celulares em resposta à infecção (Baggiolini et al., 1997).

Contudo, níveis acentuadamente elevados ou reduzidos dessas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em determinadas doenças, estão associadas à imuno-patogênese. Como observados em infecção pelo vírus do Nilo Oeste, onde níveis elevados de MCP-1, que tem como principal função atrair monócitos (Baggiolini et al., 1997), estão ligados a danos teciduais (Huang et al., 2011), na infecção pelo vírus Dengue em camundongo está associado a hemorragias intensas, danos hepáticos e consequentemente morte (Phanthanawiboon et al., 2016). As quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β estão associadas a adesão e migração celular (monócitos, linfócitos, células dendríticas) (Owen-Lynch et al., 2009). E níveis elevados de MIP-1 α , MIP-1 β na infecção pelo vírus Dengue foram associados à imuno-patogênese da doença, assim como níveis elevados de TNF- α , IFN- γ (Spain-Santana, Marglin and Rothman, 2001; Rathakrishnan et al., 2012; Póvoa et al., 2016; Inyoo et al., 2017). A quimiocina RANTES possui propriedade quimiotáticas sobre células inflamatórias (Wen et al., 2014) e níveis elevados desse mediador imune foi associado ao aumento da gravidade da doença, na infecção pelo vírus Zika (Kam et al., 2017) e Dengue (plaquetopenia) (Rathakrishnan et al., 2012).

GM-CSF está envolvido em proliferação celular, diferenciação e ativação de monócitos, granulócitos e células dendríticas (revisado por Rosler & Herold, 2016; Sadeghi et al., 2016). Assim como FGF que está envolvida na proliferação celular,

crescimento do tecido e diferenciação (Suzuki et al., 2016). Níveis reduzidos de GM-CSF (Rathakrishnan et al., 2012) FGF (Rathakrishnan et al., 2012) foram associados ao agravamento na infecção pelo vírus Dengue.

Outros mediadores imunes, tal como VEGF estão associados a angiogêneses de células endoteliais tumorais (Zhao et al., 2016), bem como IL-8 no qual sua ativação massiva pode promover a progressão de cânceres (Revisado por Long et al., 2015; Zhang et al., 2016), outros mediadores, PDGF, estão associados a angiogêneses durante a formação dos ossos (Li et al., 2016).

Níveis elevados de eotaxina na asma alérgica estão associados à gravidade da doença (revisado por Larose et al., 2017).

A quimiocina G-CSF estimula a medula óssea a produzir células tronco hematopoiéticas e granulócitos (Wu et al., 2016). Diversos estudos mostram a capacidade do G-CSF em promover a proliferação celular, plasticidade neuronal e desenvolvimento de habilidade motora (Li et al., 2016), além de aumentar a atividade dos neutrófilos (Lee et al., 2016). Diversos estudos mostram seus efeitos neuroprotetor através da angiogênese e neurogênese (Kang & Park, 2015), tem a capacidade acelerar a recuperação da medula óssea (Barroso-Sousa et al., 2016).

1.8. Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento na infecção pelo ZIKV

Em relação ao perfil inflamatório na infecção pelo ZIKV, existe uma escassez de informações quanto aos aspectos imunológicos. Um estudo realizado em 2016 avaliou o perfil de citocinas no soro de seis pacientes nas fases aguda (período inferior a 10 dias de infecção) e de convalescência (período superior a 10 dias de infecção) (Tappe et al., 2016). Os autores verificaram um aumento das seguintes citocinas na fase aguda: IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, proteína induzida por interferon γ (IP-10), RANTES, MIP-1 α , fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), IL-2, IL-4, IL-9 e IL-17. Na fase de convalescência, as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, IP-10, RANTES, MIP-1 α , VEGF permaneceram aumentadas, mantendo o mesmo perfil da fase aguda. Porém, nessa fase, houve um aumento das citocinas IL-8, MIP-1 β , fator de crescimento fibroblasto (FGF), fator estimulante de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF) (Maharajan et al., 2016; Tappe et al., 2016).

Em outro estudo, avaliou-se o crescimento do ZIKV em células pulmonares (A549), mostrando que o vírus conseguiu infectá-las eficientemente, bem como estimular uma rápida secreção de IL-1- β , IL-6, IL-8, MCP-1 e IFN- β , tendo este último, prolongado o tempo de sobrevivência das células infectadas, provavelmente por seu efeito antiviral exercer potencial proteção contra o vírus. (Frumence et al., 2016.)

Um estudo avaliou o crescimento do ZIKV em células glomerulares (podócitos glomerular, células endoteliais glomerulares renais e células mesangiais), mostrando que essas células são permissivas à infecção pelo vírus, bem como estimular a produção de IL-1 β , RANTES e IFN- β , tendo esse último prolongado a sobrevivência das células infectadas, tornando o glomérulo como um potencial reservatório viral no compartimento renal (Alcendor, 2017).

2 JUSTIFICATIVA

Desde 2015, no Brasil, depois de exaustivas evidências, observou-se uma associação entre a infecção pelo vírus Zika, microcefalia e síndrome de Guillain-Barré. Doenças autoimunes, como a síndrome de Guillain-Barré, podem ocorrer quando o sistema imune responde de forma exacerbada, levando ao desenvolvimento da doença. Considerando que estamos diante de uma doença inédita e com proporções ainda não totalmente esclarecidas, é necessário estudar os mediadores imunes no contexto da infecção pelo vírus Zika em área endêmica para o melhor entendimento dos aspectos inflamatórios e imunes da infecção. Uma vez que indivíduos expostos ao vírus Dengue, quando infectados posteriormente pelo vírus Zika, podem montar uma resposta imune mais rápida e com maior magnitude. Goiás apresenta um cenário favorável para a infecção pelo ZIKV, considerando a co-circulação do vírus Dengue e pela alta cobertura vacinal contra febre amarela. Segundo a secretaria do estado de saúde, a região metropolitana de Goiânia apresenta uma das taxas mais elevadas de incidências de dengue do Brasil, devido à alta infestação de *Ae. Aegypti* (SES, 2017). Ao longo dos anos, as citocinas já têm sido amplamente estudadas em diversas patologias por atuarem na ativação/recrutamento de leucócitos e assim, modularem a resposta inflamatória frente a antígenos. Com a necessidade de melhor entendimento da imuno-patogênese dessa infecção e a escassez de informação relacionada ao perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento associados à infecção pelo ZIKV, o objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de mediadores imunológicos durante a infecção pelo vírus Zika nas fases aguda e convalescente da infecção em área endêmica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de mediadores imunológicos durante as fases aguda e convalescente na infecção do vírus Zika em área endêmica.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Confirmar a infecção viral em indivíduos suspeitos de infecção pelo vírus Zika;

3.2.2 Descrever as características sociodemográficas e clínicas da população estudada;

3.2.3 Caracterizar os perfis plasmáticos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nos indivíduos infectados pelo vírus Zika na fase aguda da infecção;

3.2.4 Comparar os perfis plasmáticos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nos indivíduos infectados pelo vírus Zika nas fases aguda e convalescente da infecção;

3.2.5 Investigar possíveis associações entre os níveis plasmáticos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento com sintomas e viremia durante a fase aguda da infecção.

4 MÉTODOS

4.1 Local e População de Estudo

O local de estudo foi o município de Goiânia. Esse apresenta clima tropical, que é propício para a proliferação do mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor do ZIKV no Brasil.

O presente estudo foi constituído por 176 indivíduos com suspeita de infecção pelo ZIKV. Os indivíduos foram recrutados do cais Guanabara, PUC-GO e clínicas particulares de Goiânia entre os meses de janeiro a maio de 2016. Dos 176 indivíduos analisados, 36 indivíduos foram positivos para ZIKV e 6 foram recrutados novamente após 20 dias do início dos sintomas para outra coleta de sangue para avaliar a fase convalescente. As amostras são de conveniência e foram coletadas no Laboratório da PUC-GO. Todas as amostras foram analisadas pela técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) a fim de investigar a infecção pelo ZIKV e excluir a infecção por CHIKV e DENV, pois essas duas infecções apresentam sintomatologia bem semelhante à infecção causada pelo ZIKV. O grupo controle foi constituído por 28 indivíduos saudáveis e as amostras foram obtidas da Central Goiana de Sorologia e Imunohematologia.

4.2 Considerações Éticas

Os indivíduos dispostos a participar voluntariamente da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1). Projeto aprovado pelo comitê de ética da PUC-GO, parecer: 46073815.9.0000.00370 (ANEXO 2).

4.3 Critérios de Inclusão

Foram incluídos na pesquisa os indivíduos que apresentaram quadro clínico sintomatológico sugestivo de infecção pelo ZIKV, como exantema, cefaleia, febre, mialgia, artralgia, hiperemia conjuntival, edema, náuseas, gânglios infartados, diarreia.

4.4 Critérios de Exclusão

Foram excluídos desta pesquisa indivíduos que não apresentaram quadro sintomatológico sugestivo de infecção pelo ZIKV, mulheres grávidas, os indivíduos que estavam fazendo uso de anti-inflamatórios e/ou apresentaram co-infecção, também foram excluídos da pesquisa indivíduos positivos para dengue e chikungunya.

4.5 Ficha de Investigação

Os participantes do estudo responderam a uma ficha de investigação abordando aspectos como idade, gênero, início dos sintomas, sintomas, dados clínicos e laboratoriais (Apêndice I).

4.6 Amostras de Sangue

Tanto para avaliar a fase aguda quanto a convalescente, foram colhidos 50 mL de sangue de cada paciente através da punção venosa. As amostras foram colhidas no sistema a vácuo (adaptador vacutainer) e o sangue foi coletado no tubo contendo anticoagulante heparina (40 mL), tubo contendo anticoagulante EDTA (5 mL) e tubo sem anticoagulante (5 mL). O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 2.500 rpm e o soro/plasma foram coletados. O soro, o plasma EDTA e o plasma heparina foram aliquotados em tubos do tipo eppendorf de 1,5 mL e armazenados no freezer – 80 °C. O plasma EDTA foi utilizado para extração do RNA viral e dosagem de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. O plasma heparina, soro e PBMC (células mononucleares do sangue periférico) foram armazenados para posteriores experimentos. Alguns indivíduos também coletaram urina para a confirmação da infecção por RT-PCR

4.7 Quantificação dos Mediadores pelo Método Luminex

Os níveis das citocinas foram determinados utilizando um imunoensaio com microesferas do tipo multiplex. Foram adicionados 50 microlitros das amostras de plasma EDTA para análise do Fator estimulador de colônia de granulócito (G-CSF), Fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), proteína quimioatrativa de monócito (MCP-1), proteína inflamatória derivada de macrófago - 1 α (MIP-1 α), proteína inflamatória derivada de macrófago - 1 β (MIP-1 β), Fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon - γ (IFN- γ), Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES), EOTAXINA, Fator de crescimento de fibroblasto (BASIC FGF), Fator de crescimento derivado de plaqueta fração BB (PDGF-BB), Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Proteína 10 induzida por interferon- γ (IP-10) e interleucina 8 (IL-8) usando um kit disponível comercialmente (kit M500KCAF0Y 27 cytokine plex, BioRad) em um analisador Luminex (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

O desenho da placa foi definido segundo o número de amostras, controles e padrões quantitativos. Logo após, as microesferas revestidas com anticorpos monoclonais contra os 27 alvos diferentes analisados foram adicionados aos poços. As amostras e padrões (variando de 0,13 a 2.000 pg/ml para cada análise) foram pipetados nos poços. Os poços foram lavados e aspirados, e uma mistura de anticorpos biotinilados secundários foi adicionada. Após a incubação por 1 hora, estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente, R-ficoeritrina (estreptavidina-RPE) foi adicionada às microesferas e incubada por 30 minutos. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços com as microesferas (mínimo de 100 por análise) uma solução tampão *sheath fluid* (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA) para serem analisadas no analisador de microesferas (Luminex 100™, Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA). As concentrações das amostras desconhecidas foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando o Bio-Plex Manager Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os níveis das citocinas foram expressos como quantidade total por poço (pg/mL).

Tabela 1 - Limite de detecção das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.

Mediadores imunes	Limite de detecção (pg/mL)	Mediadores imunes	Limite de detecção (pg/mL)
L-8	1,0	MCP-1	1,1
Eotaxina	2,5	MIP-1 α	1,6
FGF	1,9	MIP-1 β	2,4
G-CSF	1,7	PDGF-BB	2,9
GM-CSF	2,2	RANTES	1,8
IFN- γ	6,4	TNF- α	6,0
IP-10	6,1	VEGF	3,1

Tabela 1- limite detecção das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. **Limite mínimo de detecção(cut-off) dos mediadores imunes**, segundo o kit do fabricante.

4.8 Extração de RNA viral

O RNA viral total foi isolado no plasma dos pacientes pelo kit *QIAamp®Viral RNA Mini* (Qiagen). O kit fundamenta-se em propriedades de ligação seletiva do RNA viral em uma membrana à base de gel-sílica sob o processo de micro centrifugação. No início do procedimento foi realizado o preparo dos reagentes. Em um tubo foi adicionado 310 µL de AVE (água livre de RNase contendo 0.04% de azida sódica) contendo 310µg de RNA transportador liofilizado para obter uma solução de 1 µg/µL. O reagente AVL (detergente para auxiliar na desnaturação das moléculas de RNase) vem pronto para uso. Para o preparo do AW1 foi adicionado 19 mL do concentrado de AW1 mais 25 mL de etanol (96%) no tubo, obtendo um volume final de 44 ml. Para o preparo do AW2, foram adicionados 13 mL de concentrado de AW2 mais 30 mL de etanol (96%). Todos esses preparos foram realizados para obter os reagentes estoques. Para realizar a extração de uma única amostra foi adicionado 0,56 ml de AVL (inativação de RNases) e 5,6 µL de RNA-AVE (melhora a ligação do RNA viral intacto à membrana QIAamp) no tubo de 1,5 ml. Foram adicionados 140 µL de plasma heparinizado nesse tubo e passado no vortex (pulso) por 15 segundos para homogeneização. Após esse procedimento, o tubo ficou em temperatura ambiente (15-25°C) por 10 minutos. Para remover gotículas da solução da tampa, essa amostra foi centrifugada brevemente. Após esse procedimento, foram adicionados 560 µL de etanol (96%) no tubo e misturado no Vórtex por 15 segundos e brevemente centrifugado para remover gotículas da tampa do tubo. Foram adicionados 630 µL da solução preparada no tubo de 2 ml (tubo de recolha) e centrifugado por 1 minuto a 6.000g (8.000 rpm). Após esse procedimento, o tubo foi colocado na coluna *QIAamp* e foram adicionados 560 µL de etanol (96%) no tubo e misturado no Vórtex por 15 segundos e brevemente centrifugado para remover gotículas da tampa do tubo. Foram adicionados 630 µL da solução preparada no tubo de 2 mL (coluna) e centrifugado por 1 minuto a 6.000g (8.000 rpm). Após esse procedimento, o tubo de 2 mL foi colocado dentro da coluna *QIAamp* e adicionado 630 µL da solução preparada no tubo de 2 mL (coluna) e centrifugado por 1 minuto a 6.000g (8.000 rpm). Realizado essa etapa, foram adicionados 500 mL da solução AW1 no tubo de 2,0 mL e centrifugado por 1 minuto a 6.000g (8.000 rpm). Após essa lavagem, o tubo contendo o filtrado foi descartado. O tubo foi aberto e adicionado 500 µL de AW2 e centrifugado por 3 minutos a 20.000g (14.000 rpm). Por fim, o RNA final foi eluído em 60 µL de tampão

AVE (água livre de RNase que contém azida de sódio, que previne crescimento microbiano e contaminação por RNase) e estava pronto para uso.

4.9 PCR em tempo real para o vírus Zika

O kit para detecção do RNA viral utilizado foi o *Zika Vírus PCR (Bioclin®, Bio gene Zika vírus PCR- K-203-6)*. Esse se baseia na transcrição reversa do genoma viral, a partir do RNA viral, obtendo-se um DNA complementar (cDNA), com posterior PCR em Tempo Real utilizada para amplificação do RNA viral. O kit possui todos os reagentes necessários para amplificação, *primers* e uma sonda fluorescente específica para o ZIKV (FAM), bem como um controle interno (VIC) e padrão, fornecidos para a validação do teste. A detecção do RNA viral e do controle da extração nas amostras foram realizadas pelo termociclador PCR Real Time (*Light Cycler® 480 II, Roche*). A curva padrão foi validada através do coeficiente de correlação (R^2), onde a faixa permitida foi considerada válida somente quando $0,99 \leq R^2 \leq 1,00$. Para o controle negativo: Quando FAM e VIC (fluoróforo – componente molecular que emite luz) são indeterminados, o resultado foi considerado negativo e amplificação é válida. O resultado foi considerado válido quando o valor de CT foi menor ou igual a 38. O kit é capaz de detectar de 10 a 1.000.000 de cópias por reação. O kit apresenta sensibilidade clínica de 99,9% e especificidade clínica de 99,9%. O software do termociclador calcula automaticamente a concentração das amostras.

A fim de excluir co-infecções, foram realizadas sorologia e RT-PCR para dengue e CHIKV com kits similares da Biolab por colaboradores do laboratório de Núcleo de Estudo e Pesquisas Imunológicas (NEPY), sob a coordenação da Prof^a Dr^a Irmtraut Araci H. Pfrimer, localizado na PUC-GO.

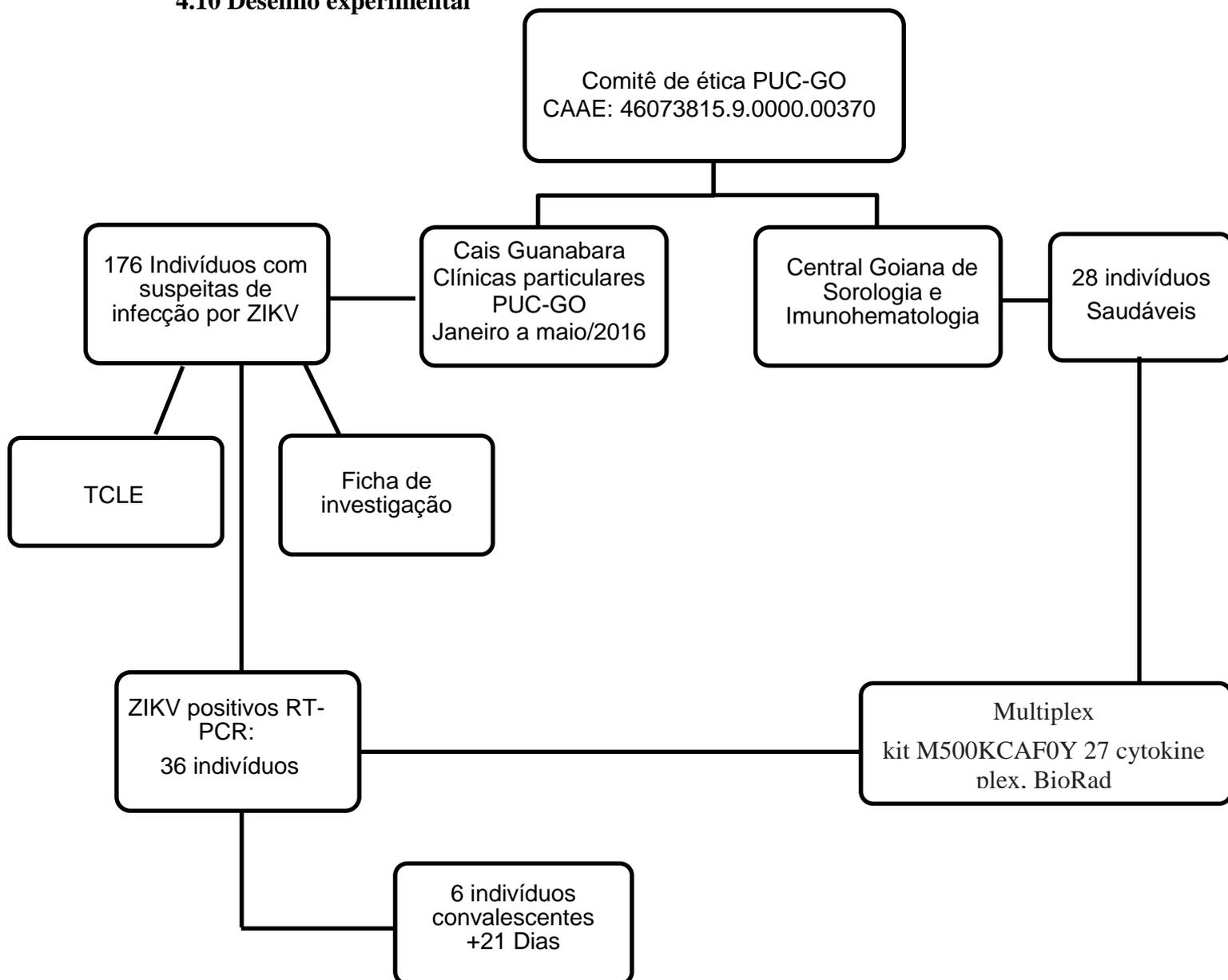
4.10 Análises Estatísticas

Os dados epidemiológicos dos sujeitos do estudo foram analisados pelo programa *Microsoft Excel*. As análises estatísticas das concentrações de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foram realizados utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0* (*Graphpad software, San Diego, CA, USA*).

As comparações entre os níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento dos pacientes ZIKV positivos com o grupo controle ou entre fase aguda e fase

convalescente foram realizadas por teste não paramétrico, *Mann-Whitney U test*, com Intervalo de Confiança de 95% (IC95). Para investigar possíveis associações entre concentrações de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento e número de sintomas dos indivíduos ou valores obtidos de CT no PCR em tempo real para o vírus Zika foi utilizado o teste de correlação de *Spearman*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4.10 Desenho experimental



5 RESULTADOS

5.1 Características dos Indivíduos do Estudo

Nesse estudo, foram incluídos 176 indivíduos com sintomas de fase aguda da infecção pelo ZIKV. Das 176 amostras analisadas por PCR em Tempo Real para o ZIKV, 140 (79,54%) foram negativas e 36 (20,45%) foram positivas. Das 36 amostras positivas, 22,2% (8) eram de pacientes do sexo masculino e 77,8% (28) eram do sexo feminino. Dos 28 doadores saudáveis, 22 eram do sexo masculino e 06 do sexo feminino, com média de idades 33,7 e 34 anos para mulheres e homens, respectivamente, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Características demográficas dos pacientes com ZIKV e doadores saudáveis.

Gênero	Infecção por ZIKV (n=36)	Idade (anos) Média (min-max)	Doadores saudáveis (n=28)	Idade (anos) Média (min-max)
M	8 (22,2 %)	36,3 (18-61)	22 (78,5%)	34 (19-59)
F	28 (77,8 %)	36,9 (23-68)	6 (21,5 %)	33,7 (18-32)

M: masculino F: feminino min: mínima max; máxima

Quando os pacientes foram questionados se realizaram algum tipo de viagem nos últimos 30 dias antes da infecção pelo vírus Zika, 14 (38,8%) relataram viagem, 12 (33,3%) não se deslocaram de Goiânia e 10 (27,9%) não informaram. As coletas foram realizadas principalmente no 2º dia após o início dos sintomas. A Tabela 3 resume as características dos indivíduos participantes do estudo.

Tabela 3. Características dos indivíduos infectados pelo ZIKV.

Nº dos Indivíduos	Gênero	Idade (anos)	Dias de sintomas	Viagens nos últimos 30 dias
1	F	34	N/I	N/I
2	F	33	N/I	N/I
3	M	36	N/I	N/I
4	M	55	2	Sim
5	F	32	3	Não
6	F	40	3	Sim
7	M	61	4	Sim
8	F	60	8	Não
9	F	68	15	Não
10	M	18	2	Sim
11	F	33	9	N/I
12	F	28	2	N/I
13	F	22	2	N/I
14	F	56	6	Não
15	F	68	3	N/I
16	F	38	3	Sim
17	F	53	3	Sim
18	F	34	3	Sim
19	F	36	4	Não
20	F	47	4	Não
21	M	24	3	Sim
22	F	37	2	Não
23	F	39	2	Não
24	F	36	8	Não
25	F	37	N/I	Sim
26	M	18	6	N/I
27	F	34	2	Sim
28	F	25	6	N/I
29	F	42	4	N/I
30	F	30	2	Sim
31	F	23	8	Não
32	M	56	4	Não
33	F	36	2	Sim
34	F	49	4	Não
50	F	28	4	Sim
51	M	18	5	Sim

N/I = Não informado; F = feminino; M = masculino

As principais manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos infectados pelo ZIKV estão listadas na Tabela 4. Entretanto, exantema e cefaleia, foram os principais sintomas associados aos indivíduos infectados.

Tabela 4 – Principais manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos infectados pelo ZIKV.

Manifestações Clínicas	Nº de indivíduos (%)
Exantema	30 (83,3)
Cefaleia	22 (61,1)
Febre	18 (50)
Mialgia	18 (50)
Artralgia	18 (50)
Hiperemia Conjuntival	13 (36,1)
Edema	10 (27,7)
Náuseas	8 (22,2)
Gânglios Infartados	6 (16,6)
Diarreia	4 (11,1)

Tabela 4 – Principais manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos infectados pelo ZIKV. As principais manifestações clínicas observadas nos indivíduos Zika⁺ foram exantema (83,3%) e cefaleia (61,1%).

Tabela 5. Valores de CT do PCR em tempo real para ZIKV nos indivíduos ZIKV+.

Identificação dos indivíduos	RT-PCR para ZIKV (CT)	Identificação dos indivíduos	RT-PCR para ZIKV (CT)
1	30,94	19	38,92
2	32,49	20	36,73
3	33,12	21	37,88
4	21,74	22	32,66
5	27,21	23	32,66
6	24,29	24	29,71

7	24,24	25	29,20
8	27,45	26	32,05
9	33,68	27	33,19
10	33,92	28	27,42
11	29,28	29	31,77
12	27,21	30	31,06
13	31,32	31	33,16
14	34,10	32	31,77
15	29,41	33	35,85
16	33,35	34	35,82
17	27,28	50	35,33
18	31,25	51	38,79

CT – do inglês cycle threshold. Curvas de monitoramento de fluorescência que ilustram a amplificação em tempo real. O nível de fluorescência computado para cada amostra é aquele suficiente para atingir um limiar de detecção igual para cada conjunto de *primers*/amostras testado e por convenção denominado de CT.

5.2. Níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias, IFN- γ e TNF- α , durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV.

Na fase aguda da infecção pelo ZIKV, houve uma elevação na concentração plasmática de interferon- γ (IFN- γ) quando comparados aos doadores saudáveis, como mostrado na **Figura 1A**. Não houve diferença significativa em relação aos níveis plasmáticos de TNF em relação aos controles (**Figura 1B**).

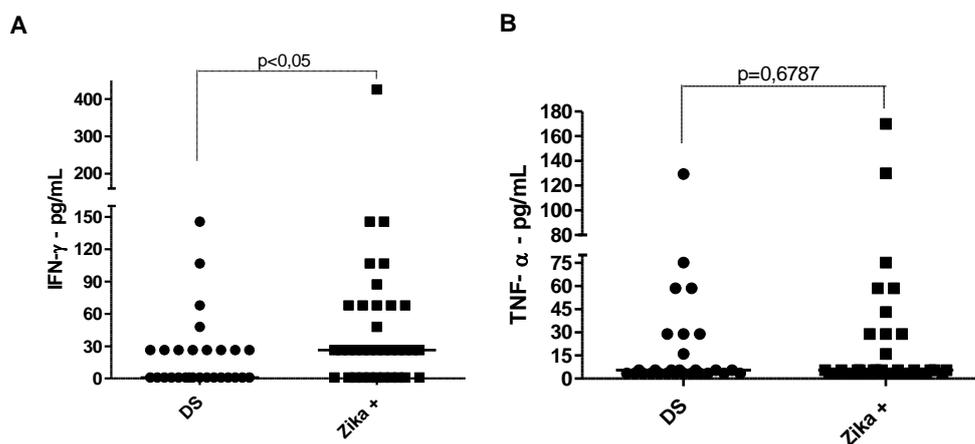


Figura 1. Níveis de IFN- γ e TNF- α no plasma dos indivíduos infectados pelo vírus Zika na fase aguda e dos doadores saudáveis. A dosagem dessas citocinas foram realizadas no plasma dos indivíduos em fase aguda na infecção pelo vírus Zika e dos indivíduos controles (doadores saudáveis, DS) pelo método multiplex e os resultados foram expressos em pg/mL. Cada símbolo nos gráficos representa a concentração plasmática da citocina de um indivíduo. As linhas horizontais representam medianas. Foi utilizado o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5.3. Níveis plasmáticos de quimiocinas durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV

Na fase aguda da infecção pelo ZIKV, houve uma elevação na concentração plasmática do IP-10 (**Figura 2A**) e RANTES (**Figura 2B**) quando comparados aos doadores saudáveis. Observou-se uma tendência de aumento dos níveis plasmáticos de MCP-1 na fase aguda da infecção ($p=0.0534$) em relação aos doadores saudáveis (**Figura 2C**). Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis plasmáticos de Eotaxina (**Figura 2D**), MIP-1 α (**Figura 2E**), MIP-1 β (**Figura 2F**) e IL-8 (**Figura 2G**) em indivíduos infectados pelo ZIKV na fase aguda e indivíduos saudáveis.

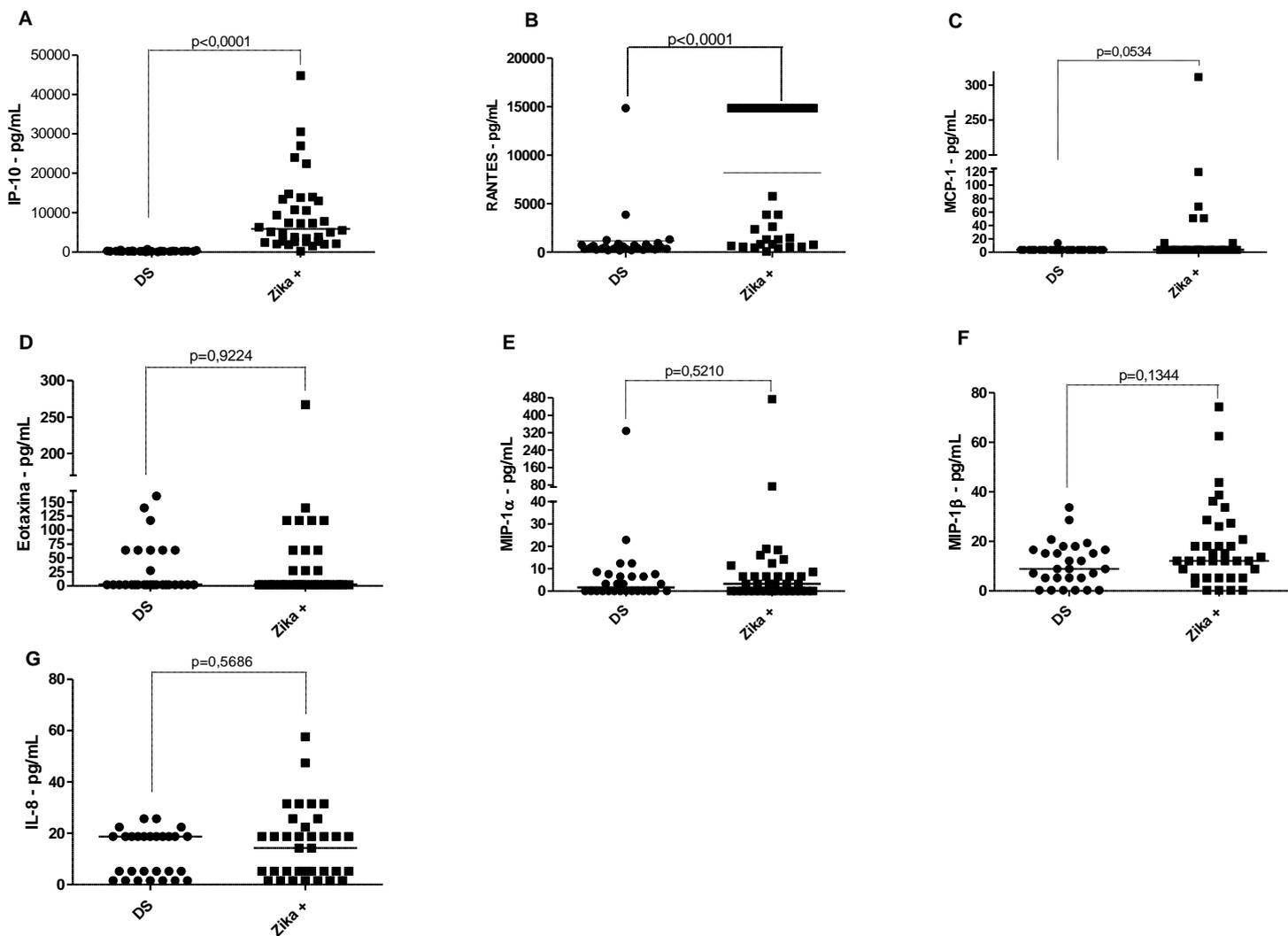


Figura 2. Níveis de MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, Eotaxina, IP-10, MCP-1 e IL-8 no plasma dos indivíduos infectados pelo vírus Zika na fase aguda. A dosagem dessas quimiocinas foram realizadas no plasma dos indivíduos em fase aguda na infecção pelo vírus Zika e dos indivíduos controles (doadores sudáveis, DS) pelo método multiplex e os resultados foram expressos em pg/mL. Cada símbolo nos gráficos representam a concentração da quimiocina de um individuo. As linhas horizontais representam medianas. Foi utilizado o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5.4. Níveis plasmáticos de fatores de crescimento durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV

Quando avaliados os níveis plasmáticos dos fatores de crescimento G-CSF (**Figura 3A**) e GM-CSF (**Figura 3B**), FGF (**Figura 3C**), PDGF-BB (**Figura 3D**) e VEGF (**Figura 3E**) não foram observadas diferenças estatísticas em relação aos indivíduos saudáveis.

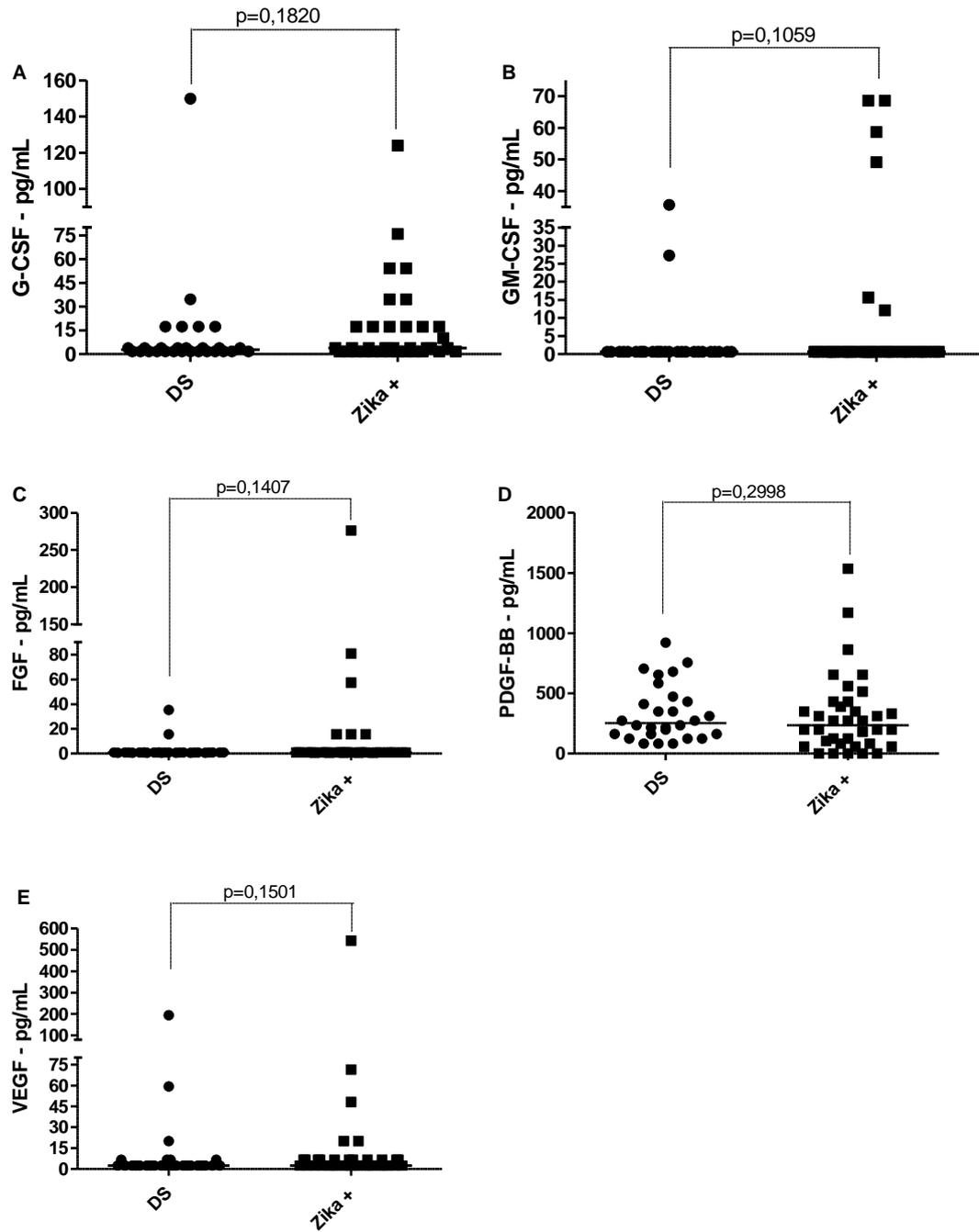


Figura 3. Níveis de G-CSF, GM-CSF, FGF, PDGF e VEGF no plasma dos indivíduos infectados pelo Zika vírus na fase aguda e dos doadores saudáveis. A dosagem desses fatores de crescimento foram realizadas no plasma dos indivíduos em fase aguda na infecção pelo vírus Zika e dos indivíduos controles (doadores saudáveis, DS) pelo método multiplex e os resultados foram expressos em pg/mL. Cada símbolo nos gráficos representa a concentração plasmática desses fatores de crescimento de um indivíduo. As linhas horizontais representam medianas. Foi utilizado o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5.5. Comparação dos níveis plasmáticos de citocinas nas fases aguda e de convalescença

Quando comparada as fases aguda e convalescente de 6 indivíduos infectados pelo ZIKV, não se observou diferenças estatísticas nos níveis plasmáticos de TNF- α (**Figura 4A**) e IFN- γ (**Figura 4B**) na fase convalescente quando comparado à fase aguda.

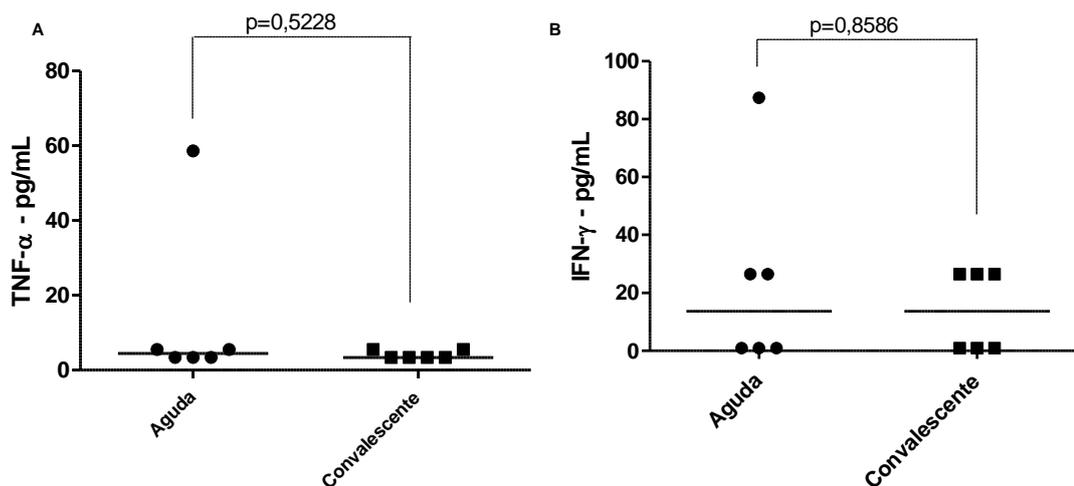


Figura 4. Níveis de TNF- α e IFN- γ no plasma dos indivíduos infectados pelo Zika vírus nas fases aguda e convalescente. A dosagem dessas citocinas foram realizadas no plasma dos indivíduos nas fases aguda e convalescente na infecção pelo vírus ZIKA pelo método multiplex e os resultados foram expressos em pg/mL. Cada símbolo nos gráficos representa a concentração da citocina de um indivíduo. As linhas horizontais representam medianas. Foi utilizado o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5.6. Comparação dos níveis plasmáticos de quimiocinas nas fases aguda e de convalescença

Quando comparados os níveis plasmáticos de quimiocinas nas fases aguda e convalescente de 6 indivíduos infectados pelo ZIKV, apenas IP-10 (**Figura 5A**) apresentou diferenças estatística. Os níveis plasmáticos das quimiocinas MIP-1 α (**Figura 5B**), MIP-1 β (**Figura 5C**), RANTES (**Figura 5D**), Eotaxina (**Figura 5E**), MCP-1 (**figura**

5F), IL-8 (Figura 5G) não apresentaram diferenças significativas quando comparadas às fases aguda e convalescente da infecção pelo vírus Zika.

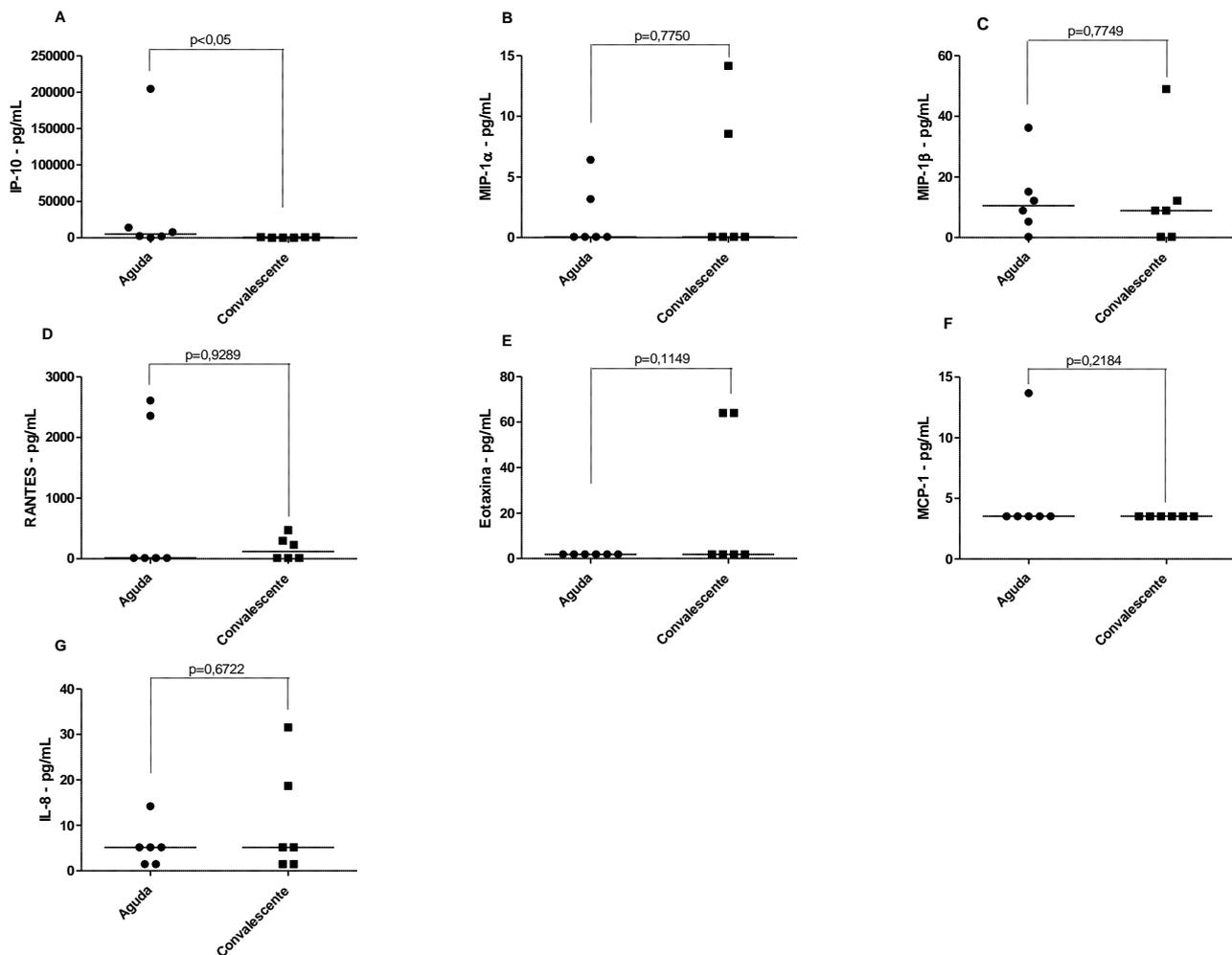


Figura 5. Níveis de MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, Eotaxina, IP-10, MCP-1 e IL-8 no plasma dos indivíduos infectados pelo Zika vírus nas fases aguda e convalescente. As dosagens dessas quimiocinas foram realizadas no plasma dos indivíduos nas fases aguda e convalescente na infecção pelo vírus ZIKA pelo método multiplex e os resultados foram expressos em pg/mL. Cada símbolo nos gráficos representa a concentração da quimiocina de um indivíduo. As linhas horizontais representam medianas. Foi utilizado o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5.7. Comparação dos níveis plasmáticos de fatores de crescimento nas fases aguda e de convalescença

Quando comparada as fases aguda e convalescente de 6 indivíduos, os fatores de crescimento G-CSF (**Figura 6A**), GM-CSF (**Figura 6B**), FGF (**Figura 6C**), PDGF-BB (**Figura 6D**) e VEGF (**Figura 6E**) não apresentaram diferenças significativas na infecção pelo vírus Zika.

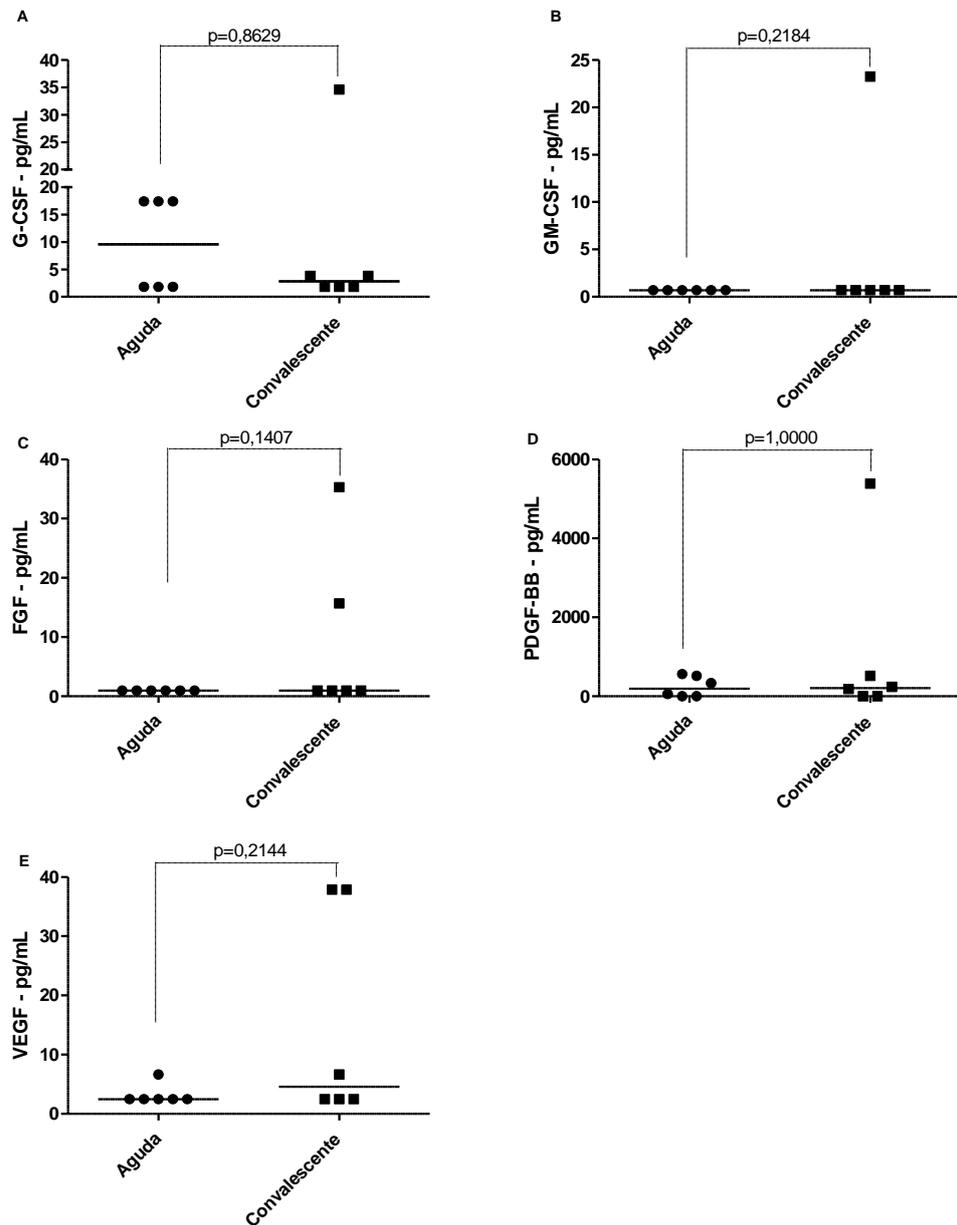


Figura 6. Níveis de G-CSF, GM-CSF, FGF, PDGF e VEGF no plasma dos indivíduos infectados pelo Zika vírus nas fase aguda e convalescente. As dosagens desses fatores de crescimento foram realizadas no plasma dos indivíduos nas fases aguda e convalescente na infecção pelo vírus ZIKA pelo método multiplex e os resultados foram expressos em pg/mL. Cada símbolo nos gráficos representa a concentração da quimiocina de um indivíduo. As linhas horizontais representam medianas. Foi utilizado o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5.8. Associação entre os níveis plasmáticos de citocinas com o número de sintomas

Investigamos se os níveis plasmáticos das citocinas estavam associados ao número de sintomas dos indivíduos infectados pelo ZIKV durante a fase aguda da infecção. Não foram observadas correlações entre os níveis das citocinas IFN- γ (**Figura 7A**) e TNF- α (**figura 7B**) e o número de sintomas apresentados pelos indivíduos.

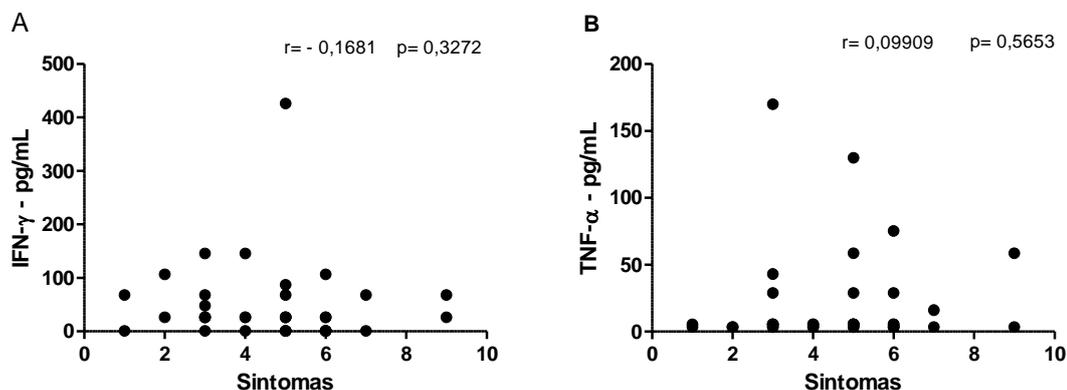


Figura 7. Associação dos níveis de IFN- γ e TNF- α no plasma dos indivíduos infectados pelo vírus Zika na fase aguda e o número de sintomas. Para avaliar a correlação entre citocinas e sintomas foi utilizado o teste não paramétrico *Spearman*. Os resultados foram expressos em pg/mL. Cada símbolo nos gráficos representa a concentração da citocina de um indivíduo. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5.9. Associação entre os níveis plasmáticos de quimiocinas com o número de sintomas

Investigamos se os níveis de plasmáticos das quimiocinas estavam associados ao número de sintomas dos indivíduos infectados pelo ZIKV durante a fase aguda da infecção. As quimiocinas MCP-1 (**Figura 8A**), MIP-1 α (**Figura 8B**), MIP-1 β (**Figura 8C**), RANTES (**Figura 8D**), Eotaxina (**Figura 8E**), IP-10 (**Figura 8F**) e IL-8 (**Figura 8G**) não apresentaram correlação com o número de sintomas.

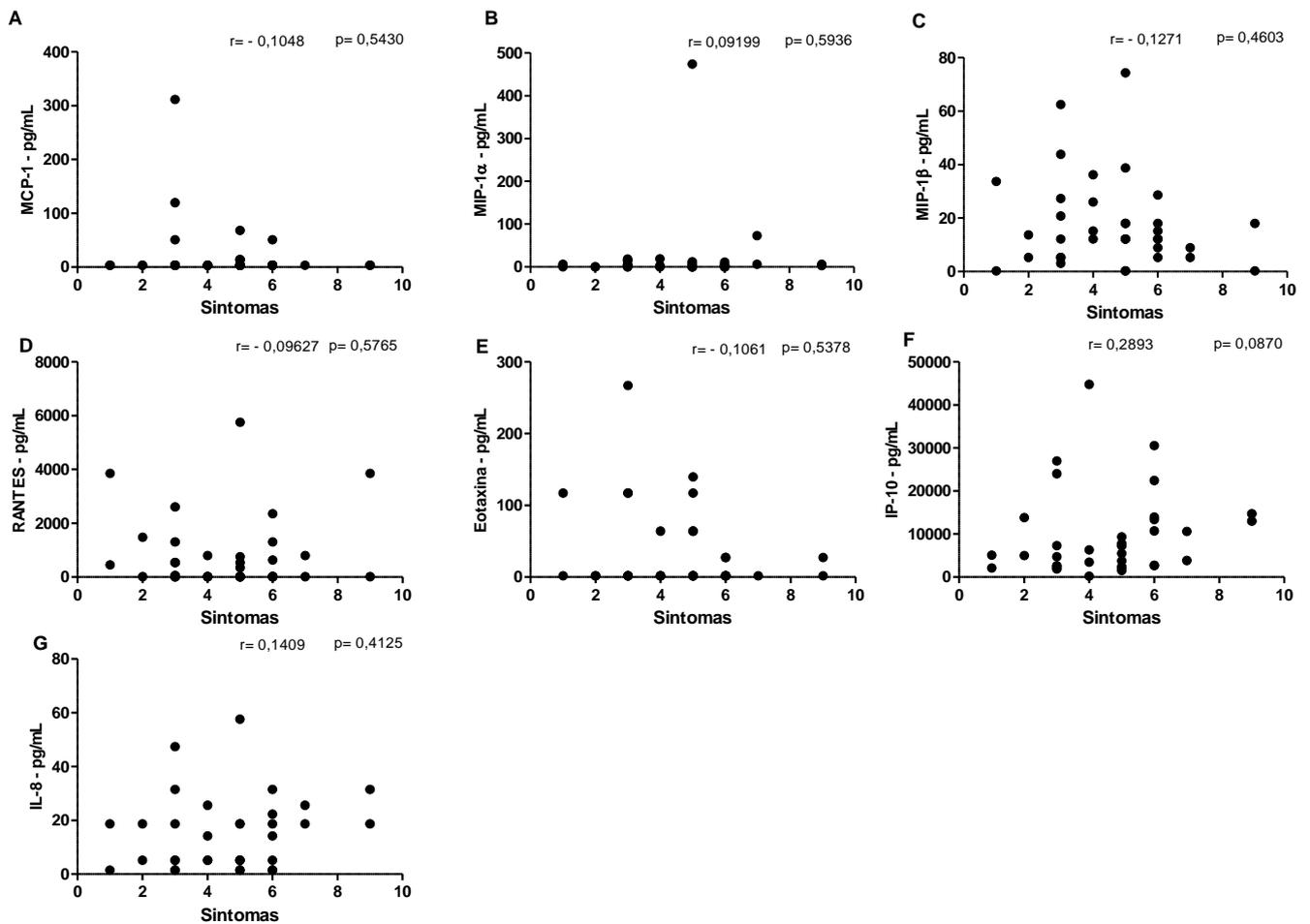


Figura 8. Associação entre os níveis plasmáticos de MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, Eotaxina, IP-10, MCP-1 e IL-8 no plasma dos indivíduos infectados pelo vírus Zika na fase aguda. Foi utilizado o teste não paramétrico *Spearman* para avaliar a correlação entre quimiocinas e sintomas. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5.10. Associação entre os níveis plasmáticos de fatores de crescimento com o número de sintomas

Investigamos se os níveis de plasmáticos dos fatores de crescimento estavam associados ao número de sintomas dos indivíduos infectados pelo ZIKV durante a fase aguda da infecção. Os fatores de crescimento G-CSF (**Figura 9A**), GM-CSF (**Figura 9B**), FGF (**Figura 9C**), PDGF-BB (**Figura 9D**) e VEGF (**Figura 9E**) não apresentaram correlação com o número de sintomas.

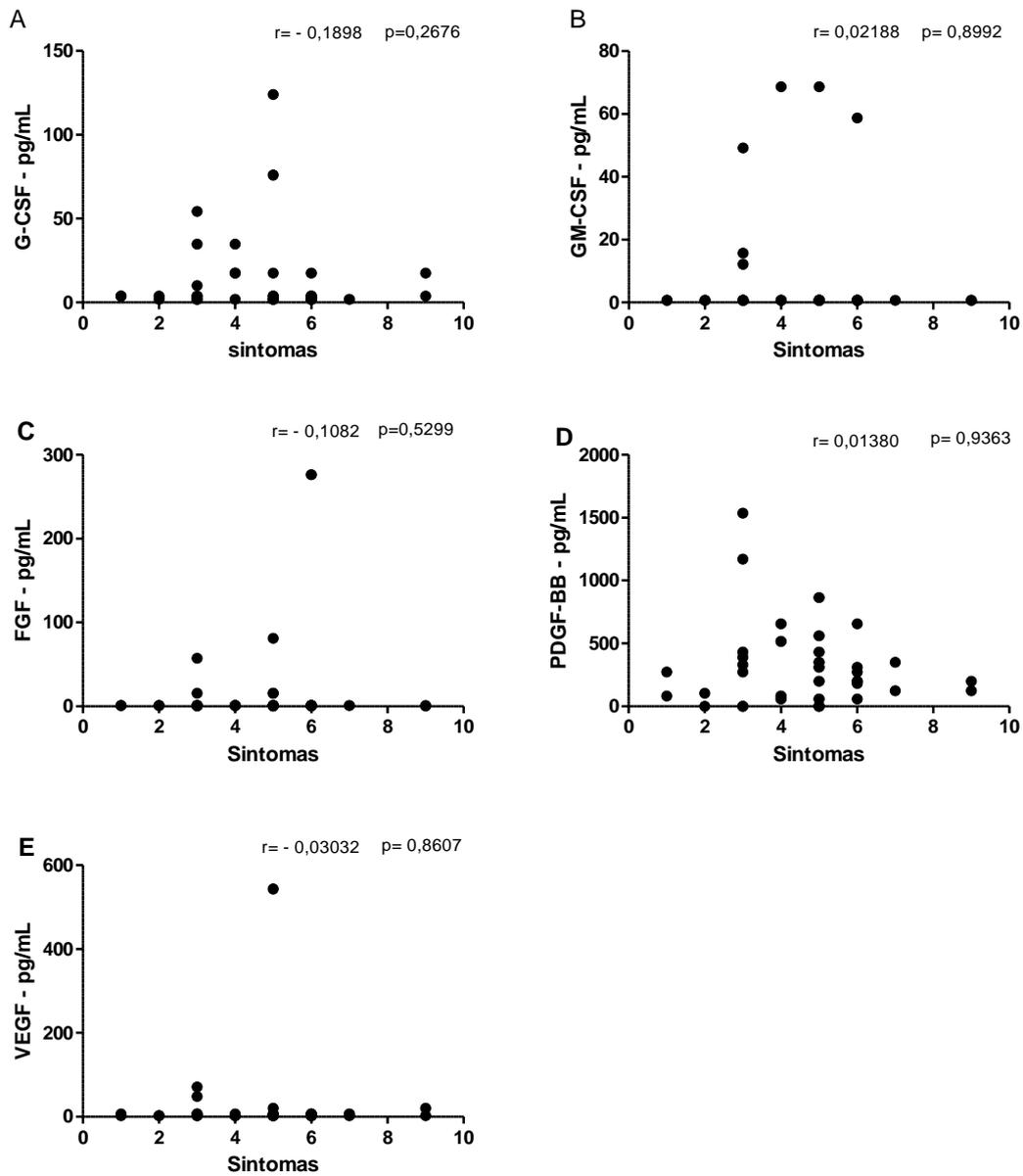


Figura 9. Associação de níveis plasmáticos de G-CSF, GM-CSF, FGF, PDGF e VEGF no plasma dos indivíduos infectados pelo vírus Zika na fase aguda e o número de sintomas. Foi utilizado o teste não paramétrico *Spearman* para avaliar a correlação entre os fatores de crescimento e sintomas. Os resultados foram expressos em pg/mL. Cada símbolo nos gráficos representa a concentração da citocina de um indivíduo. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5.12. Associação dos níveis plasmáticos de citocinas e carga viral

Investigamos se os níveis plasmáticos das citocinas estavam associados à carga viral dos indivíduos infectados pelo ZIKV durante a fase aguda da infecção. IFN- γ e TNF não apresentaram correlação com a carga viral.

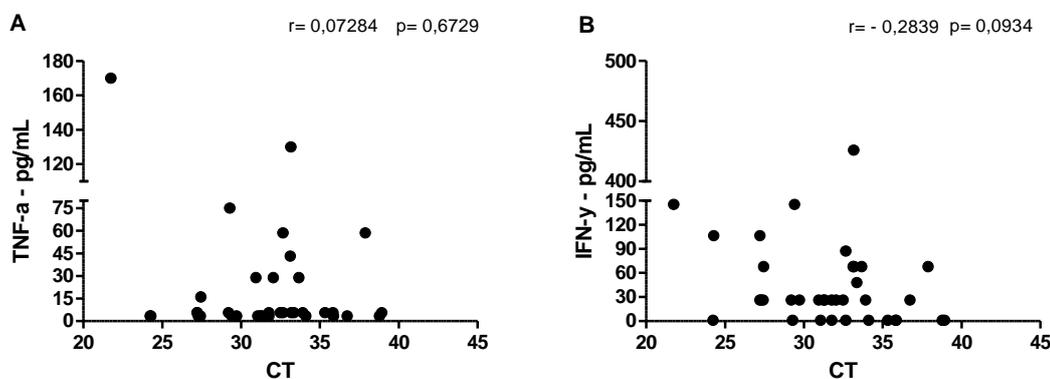


Figura 11. Associação entre os níveis plasmáticos de TNF- α e IFN- γ no plasma dos indivíduos infectados pelo vírus Zika na fase aguda e a carga viral. Foi utilizado o teste não paramétrico *Spearman* para avaliar a correlação entre citocinas e carga viral. Os resultados foram expressos em pg/mL. Cada símbolo nos gráficos representa a concentração da citocina de um indivíduo. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5.13. Associação dos níveis plasmáticos de quimiocinas e carga viral

Investigamos se os níveis plasmáticos das quimiocinas estavam associados à carga viral dos indivíduos infectados pelo ZIKV durante a fase aguda da infecção. O MCP-1 (Figura 12A), MIP-1 α (Figura 12B), MIP-1 β (Figura 12C), RANTES (Figura 12D), IP-10 (Figura 12E), Eotaxina (Figura 12F) e IL-8 (Figura 12G) não apresentaram correlação com a carga viral.

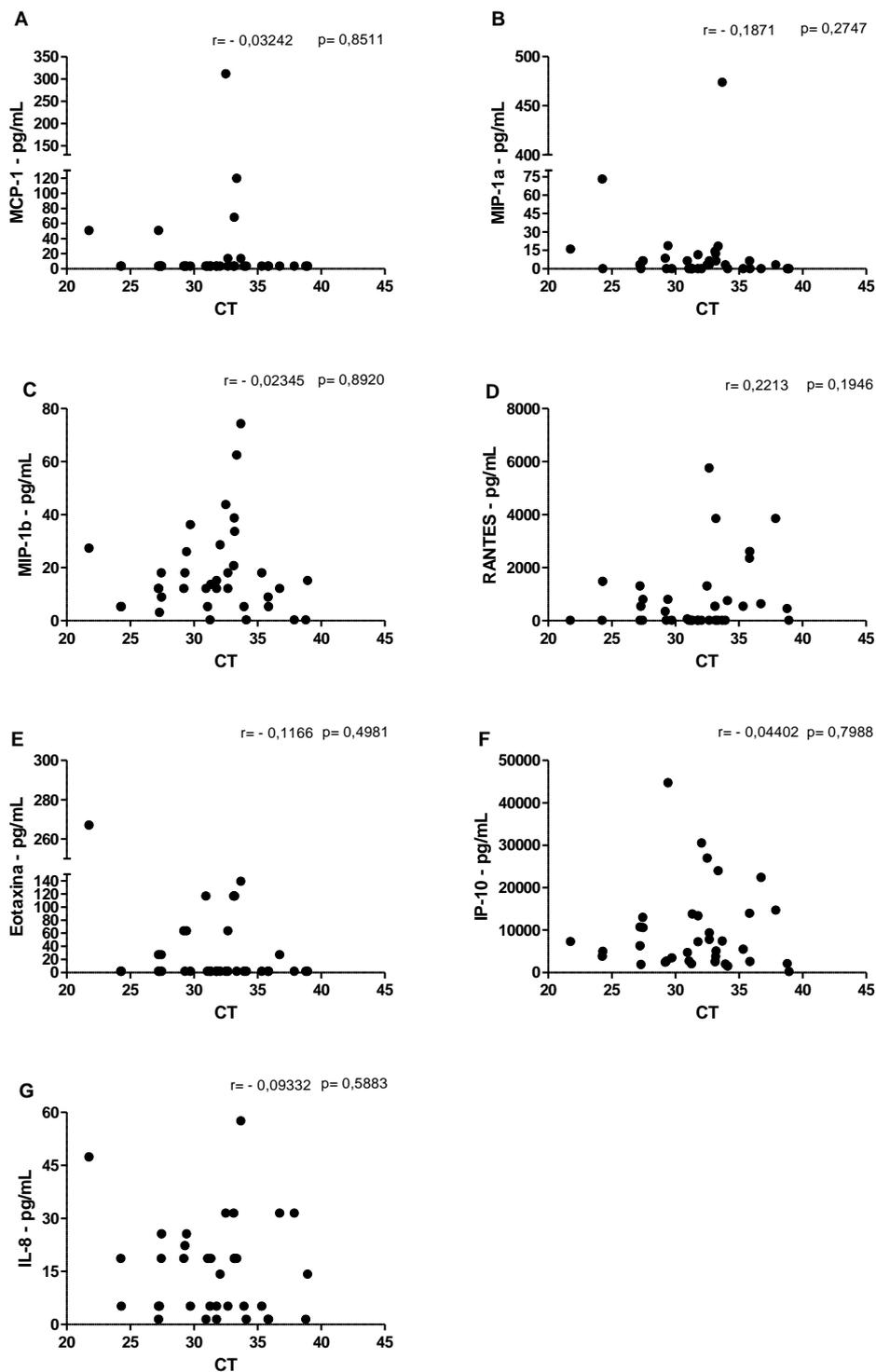


Figura 12. Associação entre os níveis plasmáticos de MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, Eotaxina, IP-10, MCP-1 e IL-8 no plasma dos indivíduos infectados pelo vírus Zika na fase aguda. Foi utilizado o teste não paramétrico *Spearman* para avaliar a correlação entre quimiocinas e carga viral. Os resultados foram expressos em pg/mL. Cada símbolo nos gráficos representa a concentração da quimiocina de um indivíduo. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

5.14. Associação dos níveis plasmáticos de fatores de crescimento e carga viral

Investigamos se os níveis plasmáticos dos fatores de crescimento estavam associados à carga viral dos indivíduos infectados pelo ZIKV durante a fase aguda da infecção. Não foram encontradas correlação entre os níveis plasmáticos de G-CSF (**Figura 13A**), GM-CSF (**Figura 13B**), FGF (**Figura 13C**), PDGF-BB (**Figura 13D**) e VEGF (**Figura 13E**) e carga viral.

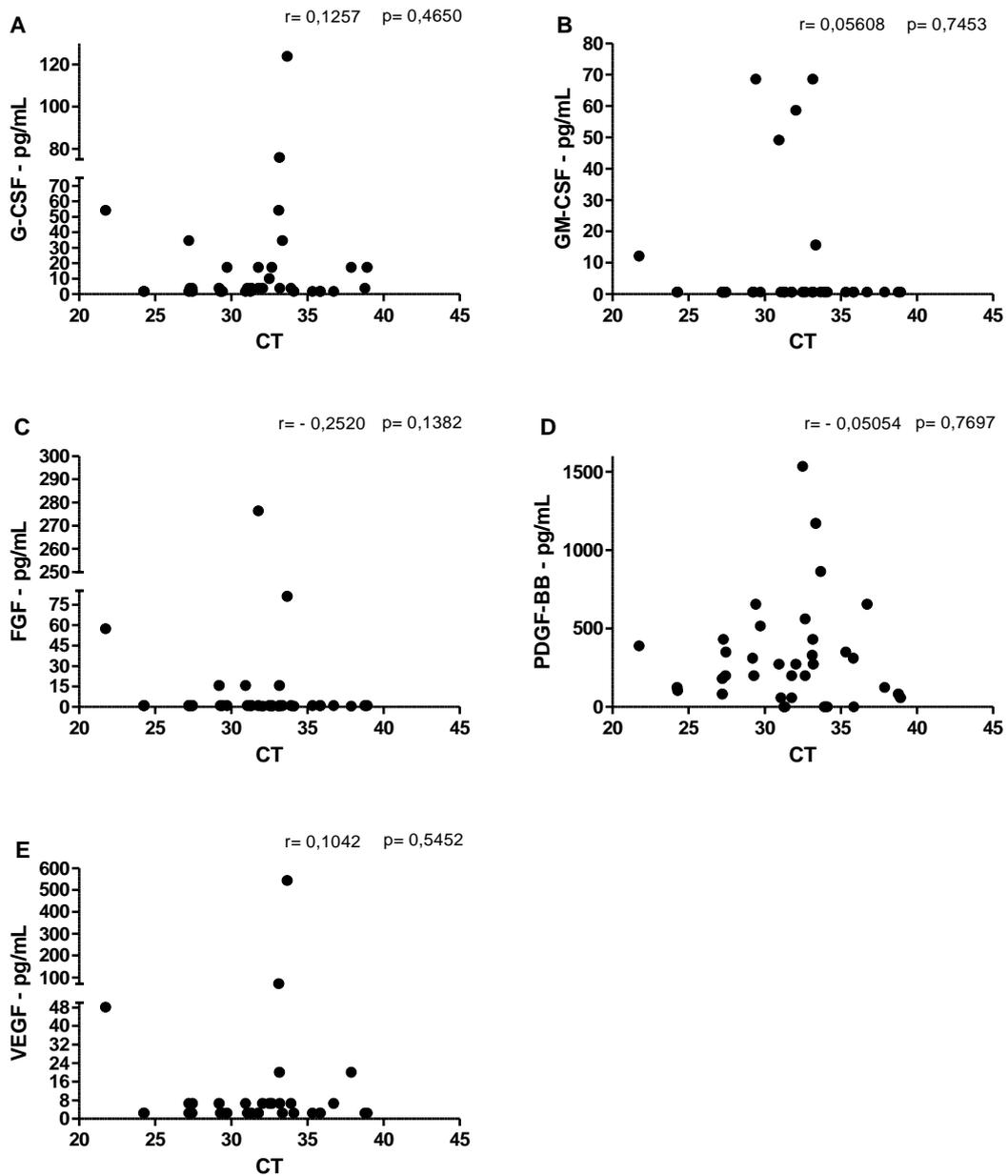


Figura 13. Associação entre os níveis plasmáticos de G-CSF, GM-CSF, FGF, PDGF e VEGF no plasma dos indivíduos infectados pelo vírus Zika na fase aguda. Foi utilizado o teste não paramétrico *Spearman* para avaliar a correlação entre fatores de crescimento e carga viral. Os resultados foram expressos em pg/mL. Cada símbolo nos gráficos representa a concentração do fator de crescimento de um indivíduo. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram investigados os mediadores imunes sistêmicos em pacientes com a infecção pelo vírus Zika em áreas endêmicas. Quantificou-se 14 moléculas (incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento) no plasma de indivíduos infectados pelo vírus Zika tanto na fase aguda quanto na fase convalescente, a fim de avaliar o perfil imunológico desses indivíduos.

Os resultados mostraram aumento significativo apenas nos níveis plasmáticos de IFN- γ , RANTES e IP-10 na fase aguda da infecção, além do aumento da quimiocina MCP-1, porém, não significativo. Esses resultados demonstram que o vírus tem a capacidade de estimular a produção de mediadores pró-inflamatórios que são importantes para a sua eliminação. No entanto, os resultados demonstram também uma baixa capacidade do vírus em estimular a produção de mediadores imunes, considerando que apenas 3 dos 14 mediadores avaliados apresentaram em níveis significativamente mais elevados quando comparados aos de indivíduos controles. Em um trabalho publicado recentemente, foi observado a capacidade do ZIKV em ativar células T, tanto as subpopulações CD4+ quanto CD8+ (Cimini et al., 2017). Esse fato associado aos altos níveis de IFN- γ observados no nosso trabalho e também por outros grupos em área endêmica (Kam et al., 2017) indicam que o ZIKV é capaz de ativar os linfócitos T CD4+ do perfil tipo I (Th1), sendo esse, muito importante para a resolução da infecção. Não foi observada a capacidade do vírus em estimular citocinas imunorreguladoras, como por exemplo, IL-10 (dados do grupo não publicados), que são importantes para regular a síntese e função citolíticas de outras citocinas do perfil Th1. Esse favorecimento na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias promove um ambiente acentuadamente pró-inflamatório, e esse ambiente pode resultar em apoptose e/ou autofagia de células do hospedeiro, podendo assim, facilitar a disseminação do vírus através de efeitos citopáticos como observados em células placentárias e progenitoras neurais (Liang et al., 2016), contribuindo para um desfecho desfavorável para o paciente.

O IFN- γ parece não ser tão eficaz quanto interferon do tipo I (interferon- α) em eliminar a infecção pelo ZIKV (Hirsche *et al.*, 2016), devido à capacidade da proteína viral NS5 em ativar simultaneamente as vias de sinalização do IFN- γ e da replicação viral, como foi observado em infecção por ZIKV *in vitro* em células de linhagem

tumorais SF268 e coriocarcinoma JEG3 (Chaudhary et al., 2017). Esses dados sugerem que níveis plasmáticos elevados de IFN- γ observados no presente estudo, podem está facilitando a disseminação das partículas virais através de danos teciduais, uma vez que não há níveis elevados de mediadores imunorreguladores para equilibrar o processo inflamatório. Contudo, em outro trabalho, o IFN- γ foi crucial para restringir a disseminação do ZIKV para outras células que são permissivas a infecção, tais como macrófagos, células dendríticas, monócitos, trofoblasto (Schmidt-Chanasit et al, 2016) e sobrevivência de animais infectados pelo ZIKV, como demonstrado no trabalho realizado em camundongos deficientes de receptores de IFN II no qual a infecção foi letal (Hirsch et al., 2016), contudo, níveis plasmáticos normais de INF- γ parece favorecer uma resposta robusta contra ZIKV em áreas não endêmicas (Tappe et al., 2016). Os dados envolvendo IFN- γ são contraditórios, novos estudos mais aprofundados são necessários para melhor conclusão do papel dessa citocina na infecção pelo ZIKV.

Os dados mostram níveis elevados da quimiocina IP-10, o que já era esperado, uma vez que níveis elevados de IFN- γ regula positivamente a produção de IP-10 (Chaudhary et al., 2017). Dentre as funções conhecidas dessa quimiocina, está a capacidade de induzir a ativação de integrinas e gerar uma migração direcionada de diversos tipos celulares (células T ativadas, monócitos, células NK) regulando, assim, o nível de inflamação (Lee et al., 2009). Juntamente com os subprodutos das células T, o IP-10 atua sinergicamente para a produção de IFN- γ , pois as células T ativadas aumentam a produção dessa citocina, que por sua vez, estimula a produção de novas moléculas de IP-10, que vai atuar em outras células e especialmente nas células T ativadas, estimulando e amplificando suas atividades pró-inflamatórias, fenômeno conhecido como *feedback* positivo (Fallahi et al., 2016). Tem sido relatado na literatura níveis elevados de IP-10 em outras infecções virais, tais como, vírus Dengue (Fallahi and Elia, 2016), Vírus Nilo Oeste (Shirato et al., 2004) e também por doenças autoimunes (Ruffilli et al., 2014). Contudo, níveis elevados dessa quimiocina têm sido associados tanto à proteção quanto a danos teciduais durante a infecção viral (Lee et al., 2009; Shirato et al., 2004). No contexto da infecção pelo vírus Zika, a quimiocina IP-10 tem sido associada a um mal prognóstico da doença, pois mulheres grávidas que tiveram níveis elevados de IP-10, além de outras moléculas imunes, tiveram fetos com alterações neurológicas, inclusive microcefalia (Kam et al., 2017). O IP-10 além de não oferecer uma proteção eficaz, ele pode levar a danos neurológicos (Ornelas et al., 2017).

Semelhante aos nossos resultados, em um estudo recente com pacientes de área endêmica no Brasil (Campinas-SP), foram encontrados níveis aumentados de IFN- γ e IP-10 em pacientes durante a fase aguda quando comparados a estudos de áreas não endêmicas (Kam et al., 2017). Tendo em vista que níveis elevados dessa quimiocina na infecção pelo vírus Dengue, Vírus do Nilo Oeste e Zika está associada ao dano, essa quimiocina poderia ser utilizada como um biomarcador de mal prognóstico nas infecções por flavivírus. Além de provavelmente estar participando sinergicamente com IFN- γ na imuno-patogênese da infecção.

Embora os níveis plasmáticos de IP-10 tenham permanecidos aumentados ao longo de 15 dias após o início dos sintomas quando comparado aos doadores saudáveis, quando comparamos os níveis plasmáticos de IP-10 na fase aguda e convalescente, observaram-se níveis reduzidos dessa quimiocina na fase convalescente. Talvez os níveis dessa quimiocina tenham sido reduzidos devido à baixa viremia nos indivíduos, uma vez que o vírus estimula a produção de IFN- γ e esse poderia estimular a produção da quimiocina IP-10. Como os níveis plasmáticos de IFN- γ na fase convalescente estavam próximos dos níveis fisiológicos, isso poderia ser uma justificativa plausível para a redução dos níveis plasmáticos de IP-10.

Em nossas avaliações, os níveis plasmáticos de RANTES apresentaram aumento na fase aguda da infecção. O que pode ser um mal prognóstico para os indivíduos infectados. Pois como já é bem estabelecido em infecções por vírus, tal como, Vírus do Nilo Oeste (Shirato et al., 2004), essa quimiocina possui propriedades quimiotáticas sobre células inflamatórias, além de ser produzida por linfócitos T, ela pode ser produzida por monócitos e fibroblastos, sendo essas últimas permissivas a infecção (Wen et al., 2014). Recente foi publicado um trabalho mostrando a capacidade do vírus Zika em estimular a produção e secreção dessa quimiocina (Alcendor et al, 2017). Contudo, a produção exacerbada de RANTES, poderá favorecer o recrutamento de células inflamatórias e posteriormente levar a uma inflamação crônica, como relatado na literatura em células da retina (Roach and alcendor, 2017). Nesse contexto, observou-se que a ativação excessiva de células produtoras de RANTES pode ser prejudicial ao hospedeiro (aumentando a inflamação), podendo promover anergia de células T protetoras (Cimini et al., 2017), com isso facilitando a infecção de novas células-alvo e disseminação da infecção.

Tappe e colaboradores avaliaram 6 indivíduos em áreas não endêmicas, e que realizaram viagens para regiões de circulação do vírus e observaram aumento nos níveis plasmáticos de VEGF, MIP-1 α , RANTES, IP-10, IL17, IL-13, IL-10, IL-9, IL-6, IL-4, IL-2, IL-1 β em fase aguda da infecção e quando avaliou a fase convalescente, observaram níveis elevados de VEGF, MIP-1 α , RANTES, IP-10, GM-CSF, IL-13, FGF, IL-6, IL-10, IL-1 β , MIP-1 β , e IL-8 (Tappe et al., 2016). Em nosso trabalho, avaliamos 27 citocinas (13 destas não mostrada pelo grupo) e observamos níveis elevados de IFN- γ , IP-10 e RANTES na fase aguda e na fase convalescente apenas IP-10 permaneceu aumentado, contudo, esses indivíduos foram avaliados em área endêmica. Nossos dados indicam que a infecção pelo ZIKV na fase aguda em áreas endêmicas tem um perfil imune sistêmico mais discreto quando comparado a áreas não endêmicas, talvez pela exposição constante dos indivíduos avaliados a fatores ambientais, uma vez que todos os envolvidos nesse estudo moram em uma região com alta circulação do vírus Dengue, somado a isso, a população é massivamente vacinada contra o vírus da febre amarela. O contato direto ou indireto (vacina com vírus atenuado) com esses vírus estimulam o organismo a montar uma resposta imune prévia (memória). Uma vez expostos a outros flavivírus, quando infectados pelo vírus Zika, o sistema imune desses indivíduos combatem o vírus mais rapidamente, mesmo que por reação cruzada, tornando a infecção pelo ZIKV menos agressivo. Embora, os indivíduos desse estudo não tenham sido acompanhados posteriormente para verificar complicações futuras.

Os níveis plasmáticos da quimiocina MCP-1 estavam aumentados na fase aguda, porém, não de forma significativa ($p=0.0534$). No contexto da infecção por ZIKV, há um trabalho mostrando níveis normais de MCP-1 tanto nas fases aguda quanto convalescente (Tappe et al., 2016). Também foram descritos níveis elevados de MCP-1 na infecção ZIKV com comprometimento ocular (Roach and Alcendor, 2017), com complicações neurológicas em fetos de mulheres que tiveram a infecção durante a gravidez (Kam et al., 2017) e, em macacos Rhesus, foi associado à disseminação viral para vários tecidos, como linfonodos, músculo e cérebro (Hirsch et al., 2017). Níveis elevados dessa quimiocina foram observados em outras infecções virais, onde o MCP-1 teve o papel associado a danos teciduais, como observados na infecção pelo vírus da encefalite japonesa em cérebros de indivíduos mortos (Ghoshal et al., 2007; Mishra et al., 2008). Níveis elevados de MCP-1 tanto no líquido cérebro-espinhal quanto no cérebro de pacientes acometidos pelo vírus da encefalite japonesa foram associados à imuno-

patogênese da infecção (Ghoshal et al., 2007; Mishra et al., 2008), assim como níveis elevados no plasma de pacientes acometidos pelo vírus Dengue (Lum et al., 2012). Embora essa quimiocina seja importante para a proteção do hospedeiro, seus níveis aumentados na infecção por flavivírus estão mais associados à participação na imunopatologia da doença do que na proteção, levando o indivíduo a um desfecho clínico desfavorável.

Nas análises das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento na fase aguda da infecção pelo ZIKV, não foram observadas diferenças estatísticas em onze (78,5%) das catorze moléculas avaliadas, sendo elas: eotaxina, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8, TNF- α , VEGF, PDGF, GM-CSF, G-CSF e FGF nos pacientes quando comparados ao grupo de doadores saudáveis. PDGF-BB é responsável por promover a proliferação celular e inibir a apoptose e, juntamente com FGF e VEGF, são responsáveis pela manutenção da rede vascular (Cao et al., 2003). O fator de crescimento G-CSF é um importante fator de crescimento para leucócitos do sistema imune (Watt et al., 2003). Na infecção pelo vírus Dengue (dengue hemorrágica) níveis baixos de PDGF, FGF, VEGF foram associados à fragilidade vascular e hemorragias devido à baixa quantidade de plaquetas (trombocitopenia), o que justifica a diminuição de quimiocinas circulante na corrente sanguínea. Nesse mesmo trabalho foram observados níveis baixos da quimiocina G-CSF, o que resultou na diminuição de leucócitos circulantes (Rathakrishnan et al., 2012).

Em nosso estudo, não foram observadas alterações significativas de PDGF, FGF, VEGF e G-CSF nas fases aguda e convalescente da infecção quando comparados aos doadores saudáveis. O que demonstra ser um ponto positivo na infecção por ZIKV, pois como observado na infecção pelo vírus Dengue, níveis reduzidos dessas moléculas, levam a hemorragias e baixa quantidade de leucócitos circulantes, aumentando a gravidade da infecção.

Outras moléculas imunes avaliadas que não tiveram aumento ou diminuição considerável estão: Eotaxina, MIP-1 α , MIP-1 β , GM-CSF e IL-8, onde seus níveis aumentados estão associados a danos na infecção por flavivírus (Li et al., 2017; Roach and Alcendor, 2017).

Nesse trabalho, os níveis de TNF- α não sofreram alterações tanto na fase aguda quanto na convalescente. O que foi uma surpresa, tendo em vista a vasta atividade

biológica dessa citocina. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória com ampla atividade biológica, dentre elas a atuação em células endoteliais vasculares, promovendo como resultado final, o aumento da permeabilidade vascular (Inyoo et al., 2017). Em infecções por outros arbovírus, os níveis de TNF- α estão aumentados (Pang et al., 2007; Martina, 2014). Na infecção pelo vírus Dengue em modelo animal, níveis elevados de TNF- α foi associado a maiores danos hepáticos e a supressão dessa citocina, foi capaz de suprimir o aumento nos níveis de IL-6, MCP1 e IFN- γ (Phanthanawiboon et al., 2016). Em modelo experimental de dengue hemorrágica em camundongo, observou-se que níveis elevados de TNF- α induziu a hemorragia através da morte de células endoteliais (Yen et al., 2008). Há estudo na literatura demonstrando que mulheres grávidas que tiveram fetos com más formações congênitas tiveram níveis elevados de TNF- α (além de outras moléculas, como: IL-22, MCP-1 e IP-10) (Kam et al., 2017). Os dados sugerem que níveis aumentados de TNF- α em pacientes imunocompetentes não há maiores gravidades, mas em pacientes imunossuprimidos (grávidas), ele está correlacionado ao aumento da gravidade da infecção.

Avaliamos se existia associação entre citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento com o número de sintomas e com a carga viral. Não foram observadas correlação entre essas moléculas com o número de sintomas, tampouco foi observada a relação dessas moléculas com a carga viral.

7 CONCLUSÕES

Nesse trabalho, foi confirmada a infecção pelo vírus Zika em 36 indivíduos dos 176 indivíduos avaliados. Os principais sintomas clínicos observados nessa infecção foram exantemas e cefaleia.

O ZIKV induz aumento dos níveis plasmáticos de IFN- γ , IP-10 e RANTES, além da forte tendência em aumentar os níveis plasmáticos de MCP-1 durante a fase aguda da infecção. Não foram observadas associações entre os níveis plasmáticos aumentados desses mediadores com viremia e sintomas. Quando comparadas fase aguda e convalescente da infecção, apenas IP-10 apresentou níveis plasmáticos significativamente diminuídos na fase convalescente. Nossos dados demonstram que a infecção pelo ZIKV, em área endêmica, com alta circulação do vírus Dengue, causa uma ativação imune sistêmica discreta, com produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Esses dados, somados aos dados da literatura discutidos nesse trabalho, sugerem que esses mediadores podem não ser suficientes para eliminar o vírus eficientemente, colaborando para imuno-patogênese da infecção e favorecendo a disseminação viral. Contudo, outra possibilidade que não deve ser descartada, é o fato da infecção prévia com outros arbovirus pode ter sido causada uma resposta imune mais eficiente e protetora. Assim, novos estudos são necessários para melhor entendimento da infecção aguda pelo vírus Zika em região endêmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar-León P, Bazalar-Palacios S, Rodriguez-Leyth H. The outbreak of Zika virus in the Americas: actions and challenges in Perú. *Le Infezioni in Medicina*, 2: 172-173, 2016.
2. Alcendor DJ. Zika Virus Infection of the Human Glomerular Cells: Implications for Viral Reservoirs and Renal Pathogenesis. *Infectious Diseases Society of America*. 2017.
3. Akey DL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J, Jurkiw TJ, DelProposto J, Ogata CM, Skinotis G, Kuhn RJ, Smith JL. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science*. 6173:881-885. 2014.
4. Araujo AQC, Silva MTT, Araujo APQC. Zika virus-associated neurological disorders: a review. *A Journal of Neurology*. 1-9, 2016.
5. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. HUMAN CHEMOKINES: An Update. *Annu. Rev. Immunol.* 15:675-705. 1997.
6. Barroso-Sousa R, Paes FR, Vaz-Luis I, Batista RB, Costa RB, Losk K, Camuso K, Metzger-Filho O, Hughes ME, Bunnell CA, Golshan M, Winer EP, Lin NU. Variation in the use of granulocyte-colony stimulating factor for dose dense paclitaxel: A single institution retrospective study. *The Breast*. 30:36-140. 2016.
7. Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, Bramley JC, Morosky S, Jr ETAM, Cherry S, Sadovsky Y, Coyne CB. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host & Microbe* 19: 1-8, 2016.
8. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P, Cao Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med*. 9:604–613.

9. Chaudhary V, Yuen KS, Chan JFW, Chan CP, Wang PH, Cai JP, Zhang S, Liang M, Kok KH, Chan CP, Yuen KY, Jin DY. Selective 1 activation of interferon- γ signaling by Zika virus NS5 protein. *J. Virol.* 2017.
10. Cimini E, Castilletti C, Sacchi A, Casetti R, Bordoni V, Romanelli A, Turchi F, Martini F, Tumino N, Nicastrì E, Corpolongo A, Caro A, Kobinger G, Zumla A, Capobianchi MR, Ippolito G, Agrati C. Human Zika infection induces a reduction of IFN- γ producing CD4 T-cells and a parallel expansion of effector V δ 2 T-cells. *Scientific reports.* 2017.
11. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, Romero S, Polonio CM, Cunha I, Freitas CL, Brandão WN, Rossato C, Andrade DG, Faria DP, Garcez AT, Buchpigel CA, Braconi CT, Mendes R, Sall AA, Zanotto PMA, Peron JPS, Muotri AR, Beltrão-Braga PCB. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 534: 2016.
12. Cyster JG. Chemokines and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs. *Science.* 286. 1999.
13. Dudley DM, Aliota MT, Mohr EL, Weiler AM, Lehrer-Brey G, Weisgrau KL, Mohns MS, Breitbach ME, Rasheed MN, Newman CM, Gellerup DD, Moncla LH, Post J, Schultz-Darken N, Schotzko ML, Hayes JM, Eudailey JA, Moody MA, Permar SR, O'Connor SL, Rakasz EG, Simmons HA, Capuano S, Golos TG, Osorio JE, Friedrich TC, O'Connor DH. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nat Commun.* 2016.
14. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Eng J Med.* 360: 2536–43, 2009.

15. Edeling MA, Diamond MS, Fremont DH. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. *Proc Natl Acad Sci.* 11:4285-4290. 2014.
16. Fallahi P, Elia G, Bonatti A. Leishmaniasis and IFN- γ dependent chemokines. *Clin Ter.* 75:e117-e122. 2016.
17. Fallahi P, Elia G. Interferon- γ -induced protein 10 in Dengue Virus infection. *Clin ter.* 6:e186-e191.2016.
18. Fahey S, Dempsey E, Long A. The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C infection. *Cellular & Molecular Immunology.* 25-40. 2014
19. Faria NR, Azevedo RSS, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, Thézé J, Bonsall MB, Bowden TA, Rissanen I, Rocco IM, Nogueira JS, Maeda AY, Vasami FGS, Macedo FLL, Suzuki A, Rodrigues SG, Cruz ACR, Nunes BT, Medeiros DBA, Rodrigues DSG, Queiroz ALN, Silva EVP, Henriques DF, Rosa EST, Oliveira CS, Martins LC, Vasconcelos HB, Casseb LMN, Simith DB, Messina JP, Abade L, Lourenço J, Alcantara LCJ, Lima MM, Giovanetti M, Hay SI, Oliveira RS, Lemos PS, Oliveira LF, Lima CPS, Silva SP, Vasconcelos JM, Franco L, Cardoso JF, Vianez-Júnior JL, SG, Mir D, Bello G, Delatorre E, Khan K, Creatore M, Coelho GE, Oliveira WK, Tesh R, Pybus OG, Nunes MRT, Vasconcelos PFC. Zika virus in the America: Early epidemiological and genetic findings. *Science.* 352:345-9. 2016.
20. Focosi D, Maggi F, Pistello M. Zika virus: implications for public health. *Clin Infect Dis.* 2:227-233. 2016.
21. Frumence E, Roche M, Krejbich-Trotot P, El-Kalamouni C, Nativel B, Rondeau P, Missé D, Gadea G, Viranaicken W, Desprès P. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. *Virology.* 493:217-226. 2016.

22. García-Bujalance S, Gutiérrez-Arroyo A, De la Calle F, Díaz-Menéndez M, Arribas JR, García-Rodríguez J, Arsuaga M. Persistence and infectivity of Zika virus in semen after returning from endemic areas: Report of 5 cases. *J Clin Virol.* 96:110-115. 2017.
23. Ghoshal A, Das S, Ghosh S, Mishra MK, Sharma V, Koli P, Sen E, Basu A. Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. *Glia.* 5:483-96. 2007.
24. Giovanetti M, Faria NR, Nunes MRT, Vasconcelos JM, Lourenço J, Rodrigues SG, Jr JLV, Silva SP, Lemos PS, Tavares FN, Martin DP, Rosário MS, Siqueira IC, Ciccozzi M, Pybus OG, Oliveira T, Junior LCA. Zika virus complete genome from Salvador, Bahia, Brazil. *Elsevier. Infection, Genetics and evolution* 41: 142-145, 2016.
25. Hirsch AJ, Smith JL, Haese NN, Broeckel RM, Parkins CJ, Kreklywich C, DeFilippis VR, Denton M, Smith PP, Messer WB, Colgin LMA, Ducore RM, Grigsby PL, Hennebold JD, Swanson T, Legasse AW, Axthelm MK, MacAllister R, Wiley CA, Nelson JA, Streblow DN. Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. *PLOS Pathogens.* 2017.
26. Huang HN, Rajanbabu V, Pan CY, Chan YL, Hui CF, Chen JY, Wu CJ. Modulation of the immune-related gene responses to protect mice against Japanese encephalitis virus using the antimicrobial peptide, tilapia hepcidin 1-5. *Biomaterials.* 32:6804-6814. 2011.
27. Inyoo S, Suttitheptumrong A, Pattanakitsakul SN. Synergistic Effect of TNF- α and Dengue Virus Infection on Adhesion Molecule Reorganization in Human Endothelial Cells. *Jpn. J. Infect. Dis.* 70:186–191. 2017.
28. Ioos S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect* 44: 302-7. 2014.

29. Kam YW, Leite JA, Lum FM, Tan JLL, Lee B, Judice CC, Teixeira DAT, Andreato-Santos R, Vinolo MA, Angerami R, Resende MR, Freitas ARR, Amaral E, Junior RP, Costa ML, Guida JP, Arns CW, Ferreira LCS, Rénia L, Proença-Modena JL, Ng LFP, Costa FTM, Network TZU. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus–Infected Patients in Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*. 216:172–81. 2017.
30. Kang W and Shin EC. Clinical Implications of Chemokines in Acute and Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Yonsei Med J*. 52(6):871-878. 2011.
31. Larose MC, Archambault AS, Provost V, Laviolette M, Flamand N. Regulation of Eosinophil and Group 2 Innate lymphoid Cell Trafficking in Asthma. *Front. Med*. 4:136. 2017.
32. Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, Diamond MS. A mouse model of Zika virus pathogenesis. *Cell Host & Microbe* 19: 1-11, 2016.
33. Lee EY, Lee ZH, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun rev*. 8:379-83. 2009.
34. Lee JA, Sauer B, Tuminski W, Cheong J, Fitz-Henley J, Mayers M, Ezuma-Igwe C, Arnold C, Hornik CP, Clark RH, JR. DKB, Smith PB, MHS, Ericson JE. Effectiveness of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Hospitalized Infants with Neutropenia. *Am J Perinatol*. 1-7. 2016.
35. Li H, Li L, Wang Y. G-CSF improves CUMS-induced depressive behaviors through downregulating Ras/ERK/MAPK signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 479:827-832. 2016.

36. Kang MH and Park HM. Administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) for the intracranial hemorrhage in two dogs: a case report. *IJVR*. 17(1):62-65. 2016.
37. Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh AA. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol*. 10:4731-4741. 2008.
38. Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo SS, Lee SA, Ge J, Wang S, Goldman SA, Zlokovic BV, Zhao Z, Jung JU. Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. *Cell Stem Cell*. 19:663-671. 2016.
39. Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA, Khromykh AA. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J Virol*. 5:2396-2404. 2006.
40. Long X, Ye Y, Zhang L, Liu P, Yu W, Wei F, Ren X, Yu J. IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways (Review). *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*. 48: 5-12, 2016.
41. Luo D, Vasudevan SG, Lescar J. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antivir Res*. 118:148-158. 2015.
42. Maharajan MK, Ranjan A, Chu JF, Foo WL, Chai ZX, Lau EYY, Ye HM, Theam XJ, Lok YL. Zika Virus Infection: Current Concerns and Perspectives. *Clinic Rev Allerg Immunol*. DOI 10.1007/s12016-016-8554-7, 2016.
43. Martina BE. Dengue pathogenesis: a disease driven by the host response. *Sci Prog*. 97:197-214. 2014.

44. McDonald EM, Duggal NK, Brault AC. Pathogenesis and sexual transmission of Spondweni and Zika viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 10:e0005990. 2017.
45. Medin CL, Rothman AL. Zika Virus: The Agent and Its Biology, With Relevance to Pathology. *College of American 2016 Pathologists*. 2016.
46. Melchjorsen J, Sørensen LN, Paludan SR. Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol. 74. 1-13. 2013.
47. Mishra MK, Kumawat KL, Basu A. Japanese encephalitis virus differentially modulates the induction of multiple pro-inflammatory mediators in human astrocytoma and astrogloma cell-lines. *Cell Biology International*. 32:1506-1513. 2008.
48. Moreira J, Lamas CC, Siqueira A. Sexual Transmission of Zika Virus: Implications for Clinical Care and Public Health Policy. *Clin Infect Dis*. 1:141-142. 2016.
49. Morris G, Barichello T, Stubbs B, Köhler CA, Carvalho AF, Maes M. Zika Virus as an Emerging Neuropathogen: Mechanisms of Neurovirulence and Neuro-Immune Interactions. *Mol Neurobiol*. 2017.
50. Musso D, Roche C, Robin E, Nahn T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*. 21(2): 2015.
51. Musso D, NILLES EJ, CAO-LORMEAU VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection*. 10:O595-O596. 2014.
52. Ornelas AMM, Pezzuto P, Silveira PP, Melo FO, Ferreira TA, Oliveira-Szejnfeld OS, Leal JL, Amorim MMR, Hamilton S, Rawlinson WD, Cardoso CC, Nixon DF, Tanuri A, Melo AS, Aguiar RS. Immune Activation in Amniotic Fluid From Zika Virus–Associated Microcephaly. *American Neurological Association*. 2016.

53. Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol.* 85:43–45. 2007.
54. Phanthanawiboon S, Limkittikul K, Sakai Y, Takakura N, Saijo M, Kurosu T. Acute Systemic Infection with Dengue Virus Leads to Vascular Leakage and Death through Tumor Necrosis Factor- α and Tie2/Angiopoietin Signaling in Mice Lacking Type I and II Interferon Receptors. *PLOS ONE.* 2016.
55. Póvoa TF, Oliveira ERA, Basílio-de-Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VLA, Salomão NG, Mota EM, Paes MV. Peripheral Organs of Dengue Fatal Cases Present Strong Pro-Inflammatory Response with Participation of IFN-Gamma-, TNF-Alpha and RANTES-Producing Cells. *PLOS ONE.* 2016.
56. Rabaan AA, Bazzi AM, Al-Ahmed SH, Al-Ghaith MH, Al-Tawfiq JA. Overview of Zika infection, epidemiology, transmission and control measures. *Journal of Infection and Public Health.* 9:589, 9, 2016.
57. Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum SCS, Manikam R, Sekaran SD. Cytokine Expression Profile of Dengue Patients at Different Phases of Illness. *PLoS ONE.* 2012.
58. Roach T, Alcendor DJ. Zika virus infection of cellular components of the blood-retinal barriers: implications for viral associated congenital ocular disease. *Journal of Neuroinflammation.* 2017.
59. Ruffilli I, Ferrari SM, Colaci M, Ferri C, Fallahi P, Antonelli A. IP-10 in autoimmune thyroiditis. *Horm Metab Res.* 9:597-602. 2014.
60. Salam AP, Horby W. The Breadth of Viruses in Human Semen. *Emerg Infect Dis.* 11:1922-1924. 2017.

61. Safronetz D, Sloan A, Stein DR, Mendoza E, Barairo N, Ranadheera C, Scharikow L, Holloway K, Robinson A, Traykova-Andonova M, Makowski K, Dimitrova K, Giles E, Hiebert J, Mogk R, Beddome S, Drebot M. Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays. *Emerg Infect Dis.* 9:1577-1580. 2017.
62. Secretaria de Estado da Saúde. https://extranet.saude.gov.br/pentaho/content/pentaho-cdf-dd/Render?solution=dengue&path=%2Fpaineis&file=resumo_boletim.wcdf&ano=2017&semana=43&userid=anonymousUser&password=anonymousUser, acessado em: 17/11/2017.
63. Shirato K, Kimura T, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Different Chemokine Expression in Lethal and Non-Lethal Murine West Nile Virus Infection. *Journal of Medical Virology.* 74:507–513. 2004.
64. Spain-Santana TA, Marglin S, Ennis FA, Rothman AL. MIP-1 alpha and MIP-1 beta induction by dengue virus. *J Med Virol.* 2:324-30. 2001.
65. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, Vanzetta F, Minola A, Jaconi S, Mele F, Foglierini M, Pedotti M, Simonelli L, Dowall S, Atkinson B, Percivalle E, Simmons CP, Varani L, Blum J, Baldanti F, Cameroni E, Hewson R, Harris E, Lanzavecchia A, Sallusto F, Corti D. Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science.* 10.1126/science.aaf8505, 2016.
66. Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarchi L, Rissland J, Ferreira DF, Jaenisch T, Gómes-Medina S, Günther S, Bartoloni A, Muñoz-Fontela C, Schmidt-Chanasit J. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol* 205: 269–273, 2016.
67. Thorpe R. Chemokine/chemokine receptor nomenclature IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature. *Cytokine.* 21:48–49. 2003.

68. Petersen E, Wilson ME, Touch S, Mccloskey B, Mwaba P, Bates M, Dar O, Mattes F, Kidd M, Ippolito G, Azhar EI, Zumla A. Rapid Spread of Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. *International Journal of Infectious Diseases* 44: 11–15, 2016.
69. Valentine G, Marquez L, Pammi M. Zika Virus-Associated Microcephaly and Eye Lesions in the Newborn. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 1–6, 2016.
70. Villordo SM, Carballeda JM, Filomatori CV, Gamarnik AV. RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation. *Trends in Microbiology*. 2016.
71. Watt G, Jongsakul K, Chouriyagune C, Paris R. Differentiating dengue virus infection from scrub typhus in Thai adults with fever. *Am J Trop Med Hyg*. 68:536-538. 2003.
72. WHO, WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations, 2005 (IHR 2005). Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. Acesso em 19/07/2016.
73. Wu CC, Wang IF, Chiang PM, Wang LC, Shen CKJ, Tsai KJ. G-CSF-mobilized Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Replenish Neural Lineages in Alzheimer's Disease Mice via CXCR4/SDF-1 Chemotaxis. *Mol Neurobiol*. 1-15. 2016.
74. Yen YT, Chen HC, Lin YD, Shieh CC, WuHsieh BA. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *Journal of Virology*. 82:12312-12324. 2008.
75. Zhao LN, Wang P, Liu YH, Cai H, Ma J, Liu LB, Xi Z, Li ZQ, Liu XB, Xue YX. MiR-383 inhibits proliferation, migration and angiogenesis of glioma-exposed

endothelial cells in vitro via VEGF-mediated FAK and Src signaling pathways. *Cellular Signalling*. 2016.

76. Zheng C, Zhou XW, Wang JZ. The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- α , TGF- β and IFN- γ . *Translational Neurodegeneration*. 5:7. 2016.
77. Zorzetto R. Zika em expansão. *Saúde*. 240: 42-47, 2016.

Anexo 1 – TCLE



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Meu nome é Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer, sou a pesquisadora responsável pelo projeto e minha área de atuação é Imunologia de doenças infecciosas. Após ler com atenção este documento e ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, **assine em todas as folhas e ao final deste documento**, que está em duas vias e também será assinado por mim, pesquisadora, em todas as folhas. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, Dra Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer, no telefone: (62) 3946-1346. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelo telefone (62) 3946-1071.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do Projeto: *“Perfil da expressão gênica em amostras de sangue de indivíduos infectados pelo vírus zika nas fases aguda e de convalescença”.*

O vírus Zika (ZIKV) é transmitido principalmente pela picada de mosquitos *Aedes*, e somente 20% dos indivíduos infectados com o vírus apresentarão sintomas da doença. Além disso, existe apenas um tipo de vírus circulante, mas que pode apresentar alterações em sua estrutura de acordo com a região em que se desenvolve.

Em geral, os casos que apresentam sintomas exibem um quadro semelhante ao da Dengue e Chikungunya, com as seguintes sintomatologias: febre, dor de cabeça, dor articular e muscular, e manchas vermelhas espalhadas pelo corpo.

Nesse projeto pretendemos realizar um estudo capaz de identificar quais as alterações no sistema imune que podem ser ocasionadas pela presença do Zika Vírus e detectar qual o tipo de vírus que o indivíduo com Zika está infectado, bem como se existe alterações na estrutura do vírus que circula no Brasil.

Assim, nossa hipótese é que há a alteração no sistema imune de indivíduos que estão infectados com o Zika vírus e que o vírus circulante no Brasil não apresenta muitas alterações em sua estrutura.

Acreditamos que a identificação das alterações no sistema imune e da estrutura viral, será útil para tratar o paciente, estratégias de controle de mosquitos e diferenciar de outras doenças também causadas pela picada de insetos.

Objetivos da pesquisa: Detectar a infecção pelo Vírus Zika em indivíduos com suspeita da doença; Quantificar o vírus Zika nos indivíduos infectados; Determinar características do sistema imune em infectados com o ZIKV e estrutura viral do mesmo.

Duração do estudo: Esse estudo está previsto para durar 2 anos. A sua participação nessa pesquisa será o tempo gasto no momento da coleta de sangue e coleta de informações para o preenchimento da ficha de investigação, com duração de 15 a 20 minutos.

Procedimentos a serem seguidos durante o estudo: Será preenchida uma ficha de investigação e, se for necessário, seu prontuário médico também poderá ser observado, para que os resultados de todos os exames que você já realizou sejam avaliados pelos pesquisadores. Serão colhidos 10 mL de sangue de sua veia para realização de testes que avaliarão se você está com o Zika Vírus, quanto de vírus há em seu organismo, para que possamos compreender como o vírus age e como pode ser combatido.

Desconfortos e riscos potenciais: Esta pesquisa por necessitar da obtenção de amostras de sangue, é considerada de risco médio, porque gera desconforto, dor durante a coleta, formação de manchas roxas no local da coleta de sangue e, ainda, tonturas. Para minimizar tais problemas, será utilizada nesta pesquisa, sala reservada para entrevista e coleta de amostra; o profissional que realizará a coleta de sangue é muito experiente e trabalha somente com coleta de sangue; todo o procedimento antes e após a coleta seguirá os padrões de segurança e Boas Práticas Laboratoriais.

Benefícios que poderão ser obtidos: Você receberá resultados de exames laboratoriais (PCR para Zika e Chikungunya) sem qualquer custo. Também será orientado quanto ao curso e desenvolvimento da doença, será aconselhado sobre como proceder após o recebimento dos resultados. Sua participação beneficiará outras pessoas por promover melhor entendimento de fatores relacionados com a origem, ao curso do Zika Vírus e reações no organismo, tratamento e desenvolvimento de vacinas, bem como cuidados relacionados ao combate do mosquito.

Compensações e custos: Todas as consultas, procedimentos e testes laboratoriais feitos especificamente para este estudo serão fornecidos a você sem nenhum custo. A equipe pesquisadora se dispõe em oferecer a você assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios em função da sua participação no estudo, afim de minimizar os transtornos causados.

1.1. Descontinuação do Estudo: Você poderá deixar de participar deste estudo ou retirar seu consentimento a qualquer momento que achar necessário sem prejuízos em seu atendimento hospitalar e sem nenhum dano moral, ético, social, financeiro, etc.

Esclarecimentos dados sobre garantias do participante da pesquisa:

- ✓ Você terá a garantia, a qualquer tempo de que receberá as informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive sobre o esclarecimento de qualquer dúvida;
- ✓ Você tem liberdade para se recusar a participar ou retirar seu consentimento e descontinuar sua participação a qualquer tempo. A participação é voluntária e a recusa em participar não envolverá nenhuma penalidade ou perda de benefícios. Recusa ou descontinuação não irão de nenhuma forma colocar em risco seu direito de receber tratamento.
- ✓ Seu médico e os demais investigadores desse estudo tratarão sua identidade com padrões profissionais de confidencialidade. Seus registros permanecerão confidenciais. Nomes de participantes ou materiais identificando participantes não serão publicados. Os participantes não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento ficará com esta equipe de pesquisa e uma será dada a você.
- ✓ Todos os procedimentos e consultas deste estudo lhe serão fornecidos sem nenhum custo. Assistência médica por danos causados direta e indiretamente relacionados com este estudo serão de responsabilidade desta equipe pesquisadora.

Eu, _____,
RG/ CPF/ nº de prontuário/ nº de matrícula _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "*Perfil da expressão gênica em amostras de sangue de indivíduos infectados pelo vírus zika nas fases aguda e de convalescença*", sob a responsabilidade da Dr^a. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer, como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data: _____

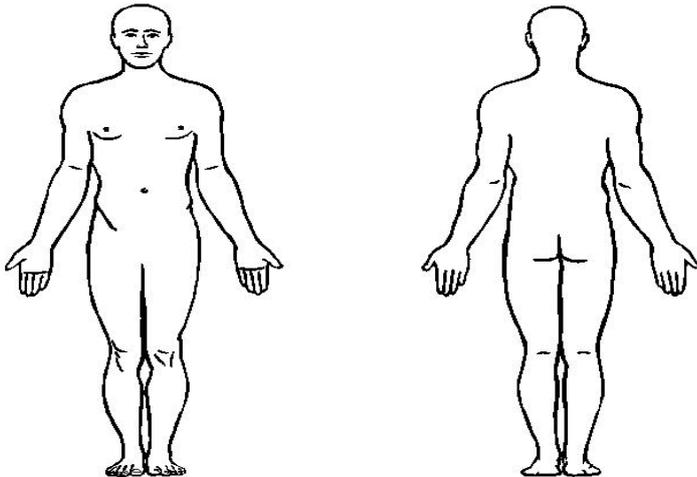
Nome e Assinatura do participante: _____

Assinatura Dactiloscópica:



Nome e assinatura do Pesquisador Responsável: _____ N. _____

Ficha de Investigação de Zika Vírus

DADOS GERAIS	Nome:	
	Município:	UF:
	Unidade de saúde:	Data do início dos sintomas: ____/____/____
	Telefone:	Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> Ignorado
	Se Gestante: <input type="checkbox"/> 1º Trim. <input type="checkbox"/> 2º Trim. <input type="checkbox"/> 3º Trim.	Viajem anterior a 30 dias:
	Escolaridade:	Ida ____/____/____ Volta ____/____/____ Local:
	Nome do Responsável legal:	
	Zona de Residência: <input type="checkbox"/> Urbana <input type="checkbox"/> Periurbana <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Ignorado	
DADOS CLÍNICOS-LABORATORIAIS	Exame para dengue: <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	
	Exame para Malária: <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	
	Exame para Mayaro: <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	
	Exames adicionais:	
	Antecedentes prévios de comorbidade: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim (_____)	
	Apresentação clínica: <input type="checkbox"/> Aguda (até 7 dias) <input type="checkbox"/> Subaguda (até 3 meses) <input type="checkbox"/> Crônica (+3 meses)	
	Hospitalização: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim (Data Internação: ____/____/____ Alta: ____/____/____)	
	Sinais e sintomas:	
	<input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Artralgia intensa <input type="checkbox"/> Cefaléia <input type="checkbox"/> Náuseas <input type="checkbox"/> Diarréia <input type="checkbox"/> Vômitos <input type="checkbox"/> Exantema <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Zumbidos no ouvido <input type="checkbox"/> Tonturas <input type="checkbox"/> Edema (identificar o local: <input type="checkbox"/> Mão <input type="checkbox"/> Punho <input type="checkbox"/> Joelho <input type="checkbox"/> Tornozelo <input type="checkbox"/> Pé <input type="checkbox"/> Gânglios enfiados <input type="checkbox"/> Hiperemia conjuntival <input type="checkbox"/> Dor nas costas <input type="checkbox"/> Outro (_____)	
<p>OBS: Marcar na figura abaixo as articulações afetadas, de acordo com o seguinte: <u>D</u>: dor; <u>E</u>: edema; <u>Ar</u>: Derrame articular; <u>V</u>: vermelhidão (uma mesma articulação pode ser marcada com mais de uma letra).</p>		
		

Anexo 2 - Parecer do Comitê de Ética.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação e Genotipagem do Vírus Chikungunya em Indivíduos dos Estados de Amapá e Goiás

Pesquisador: ROSEMARY KOGA

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 46073815.9.0000.0037

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC/Goiás

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.362.875

Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta a pendência.

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de resposta a pendência.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de resposta a pendência.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de resposta a pendência.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de resposta a pendência.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pendência foi sanada.

Projeto de pesquisa aprovado.

Apêndice – Artigo publicado em versão inglesa



Acute Zika Virus Infection in an Endemic Area Shows Modest Proinflammatory Systemic Immunoactivation and Cytokine-Symptom Associations

Jéssica Barletto de Sousa Barros^{1†}, Paulo Alex Neves da Silva^{2†}, Rosemary de Carvalho Rocha Koga¹, Patrícia Gonzalez-Dias³, José Rodrigues Carmo Filho¹, Patrícia Resende Alo Nagib², Verônica Coelho^{4,5}, Helder I. Nakaya^{3*}, Simone Gonçalves Fonseca^{2,5*} and Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Teizo Yoshimura,
Okayama University, Japan

Reviewed by:

Toshihiro Ito,
Nara Medical University, Japan
Tomozumi Imamichi,
National Cancer Institute at
Frederick, United States

*Correspondence:

Helder I. Nakaya
hnakaya@usp.br;
Simone Gonçalves Fonseca
fonseca.simone@gmail.com;
Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer
araci@pfrimer.com.br

[†]These authors have contributed
equally to this work, as co-first
authors.

Specialty section:

This article was submitted
to Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 02 November 2017

Accepted: 04 April 2018

Published: 03 May 2018

Citation:

Barros JBS, Silva PAN, Koga RCR,
Gonzalez-Dias P, Carmo Filho JR,
Nagib PRA, Coelho V, Nakaya HI,
Fonseca SG and Pfrimer IAH (2018)
Acute Zika Virus Infection in an
Endemic Area Shows Modest
Proinflammatory Systemic
Immunoactivation and Cytokine-
Symptom Associations.
Front. Immunol. 9:821.
doi: 10.3389/fimmu.2018.00821

¹ Department of Master in Environmental Sciences and Health, School of Medical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Pontifical Catholic University of Goiás, Goiânia, Brazil, ² Department of Microbiology, Immunology, Parasitology and Pathology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil, ³ Department of Pathophysiology and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁴ Laboratory of Immunology, Heart Institute (InCor), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁵ Institute for Investigation in Immunology – National Institute of Science and Technology – iii – INCT, São Paulo, Brazil

An early immune response to Zika virus (ZIKV) infection may determine its clinical manifestation and outcome, including neurological effects. However, low-grade and transient viremia limits the prompt diagnosis of acute ZIKV infection. We have investigated the plasma cytokine, chemokine, and growth factor profiles of 36 individuals from an endemic area displaying different symptoms such as exanthema, headache, myalgia, arthralgia, fever, hyperemia, swelling, itching, and nausea during early-phase infection. These profiles were then associated with symptoms, revealing important aspects of the immunopathophysiology of ZIKV infection. The levels of some cytokines/chemokines were significantly higher in acute ZIKV-infected individuals compared to healthy donors, including interferon (IFN) gamma-induced protein 10 (IP-10), regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), IFN- γ , interleukin (IL)-9, IL-7, IL-5, and IL-1ra, including some with predominantly immunoregulatory activity. Of note, we found that higher levels of IP-10 and IL-5 in ZIKV-infected individuals were strongly associated with exanthema and headache, respectively. Also, higher levels of IL-1ra were associated with subjects with arthralgia, whereas those with fever showed lower levels of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). No correlation was observed between the number of symptoms and ZIKV viral load. Interestingly, only IP-10 showed significantly decreased levels in the recovery phase. In conclusion, our results indicate that acute ZIKV infection in a larger cohort resident to an endemic area displays a modest systemic immune activation profile, involving both proinflammatory and immunoregulatory cytokines and chemokines that could participate of virus control. In addition, we showed that differential cytokine/chemokine levels are related to specific clinical symptoms, suggesting their participation in underlying mechanisms.

Keywords: acute Zika virus infection, cytokines, chemokines, symptoms, immune response, low viremia, immuno-activation

INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) infection is an emerging endemic disease, with recent outbreaks in the Americas (1). Approximately 80% of ZIKV infections are asymptomatic, while symptomatic cases present similar clinical features to dengue and chikungunya fevers, and are characterized mainly by exanthema, fever, headache, arthralgia, myalgia, and conjunctivitis (2–5). However, in the recent outbreaks, adult ZIKV infection was associated with Guillain–Barré syndrome (6), myelitis, meningoencephalitis (7, 8), and a fetal neurological syndrome involving microcephaly (9–11). ZIKV has been detected in fetal brain tissue, suggesting neurotropism (12), and in body fluids such as blood, urine, saliva, tears, and semen for >6 months, suggesting viral persistence and dissemination (13).

Due to the absence of symptoms or presence of mild ones, little is known about the early immune response to ZIKV infection in humans. *In vitro* studies have demonstrated that many different cell types, including glomerular cells (14), retinal endothelial cells (15, 16), brain microvascular endothelial cells (17), dendritic cells (18), and monocytes (19, 20) can be infected by ZIKV. Changes in pro- and anti-inflammatory cytokines have been reported in a small group of six individuals, who were infected with ZIKV while visiting endemic areas (21). Considering the small number of patients in that study, an evaluation of immune mediators in the acute phase in a larger cohort of patients residing in an endemic area may shed some light on the immunopathophysiology of ZIKV infection.

In this work, we investigated the levels of a broad array of cytokines, chemokines, and growth factors during acute ZIKV infection in an endemic area in Brazil. We examined the levels of 27 immune-active molecules with distinct functions, including pro- and anti-inflammatory cytokines with Th1, Th2, Th17, Th9, and Treg cell expression patterns, as well as chemokines, and growth factors involved in innate and adaptive immune responses. Only seven cytokines displayed higher levels in acutely infected patients compared to healthy individuals. We found significantly higher levels of IL-1ra in ZIKV-infected individuals with arthralgia and IL-5 in those with headache. Interestingly, higher levels of interferon (IFN) gamma-induced protein 10 (IP-10) were associated with exanthema, whereas lower levels of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) were detected in subjects with fever, suggesting that cytokines can either induce or control the clinical symptoms of ZIKV infection.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

Ethical approval for this study was obtained from the Institutional Review Board of Pontifical Catholic University of Goiás (CEP—Research Ethics Committee), under the protocol number 46073815.9.0000.00370. All study subjects signed a written informed consent form before the interview, and blood and urine collection was performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

Study Participants and Sample Collection

Our study cohort included 36 individuals aged 18–68 years (median 36 years), from Goiânia, Goiás, Brazil, who developed

acute Zika-like symptoms during the Brazilian ZIKV outbreak in January–May 2016, and had a ZIKV diagnosis confirmed by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Eight of the 36 ZIKV-infected subjects (22.2%) were males and 28 (77.8%) were females (**Table 1**). Subjects were eligible to participate in this study if they were at least 18 years old. Subjects positive for dengue and chikungunya by RT-PCR were excluded. As controls, 28 healthy potential blood donors, aged 18–59 years (median 33 years) and displaying negative blood tests for several infectious diseases, were recruited from the Center of Serology and Immunohematology of Goiânia, Brazil. All subjects were invited to participate in the study after being provided an explanation of the research, and all signed a written informed consent form. ZIKV-infected subjects were interviewed in a private room and answered a written questionnaire regarding the day of symptom onset, types of symptoms, and demographic features. Blood collection from ZIKV-infected subjects was performed at enrollment, 1–15 days after symptom onset. Urine samples were

TABLE 1 | Characteristics of Zika virus (ZIKV)-infected subjects.

Subject code	Sex ^a	Age (years)	Days (symptom onset to sampling)	qPCR ZIKV (C.T.) ^b
1	F	34	NA ^c	30.94
2	F	33	NA	32.49
3	M	36	NA	33.12
4	M	55	2	21.74
5	F	32	3	27.21
6	F	40	3	24.29
7	M	61	4	24.24
8	F	60	8	27.45
9	F	68	15	33.68
10	M	18	2	33.92
11	F	33	9	29.28
12	F	28	2	27.21
13	F	22	2	31.32
14	F	56	6	34.10
15	F	68	3	29.41
16	F	38	3	33.35
17	F	53	3	27.28
18	F	34	3	31.25
19	F	36	4	38.92
20	F	47	4	36.73
21	M	24	3	37.88
22	F	37	2	32.66
23	F	39	2	32.66
24	F	36	8	29.71
25	F	37	NA	29.20
26	M	18	6	32.05
27	F	34	2	33.19
28	F	25	6	27.42
29	F	42	4	31.77
30	F	30	2	31.06
31	F	23	8	33.16
32	M	56	4	31.77
33	F	36	2	35.85
34	F	49	4	35.82
50	F	28	4	35.33
51	M	18	5	38.79

^aSex: M, male; F, female.

^bCT, cycle threshold (<39).

^cNA, non-available.

also collected from the ZIKV-infected group. Six ZIKV-infected subjects underwent a second blood collection 2–3 weeks after the first sample to evaluate the recovery phase. Blood samples were collected into ethylenediaminetetraacetic acid-coated Vacutainer tubes (Becton & Dickinson, USA), and the plasma was separated and stored at -80°C until analysis. Specimens from individuals with symptoms of ZIKV infection were handled using biosafety level 2 precautions, following all the safety criteria indicated by the precaution standards of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and described in the Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health publication Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.¹

ZIKV Real-Time RT-PCR

Viral RNA was obtained from plasma or urine using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR for ZIKV was performed using a kit (Bioclin[®], Bio gene ZIKV PCR-K-203-6), with the following primers and probes: ZIKV-F, 5'-CCGCTGCC CAACACAAG-3'; ZIKV-R, 5'-CCACTAACGTTCTTTTGCAG ACAT-3'; ZIKV-P, 5'-FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGT CAGACTCAA-BHQ1-3', developed according to Lanciotti et al. (22), with modifications. RT-PCR was performed following the manufacturer's instructions. RT-PCR was also performed to detect the viruses causing chikungunya and dengue fevers.

Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Quantification

The quantitative detection of 27 cytokines [interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IL-1 β , IL-1 receptor antagonist (IL-1ra), chemokines (MCP-1) (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), RANTES (CCL5), IP-10 (CXCL10), IL-8 (CXCL8), eotaxin] and growth factors (basic FGF, G-CSF, GM-CSF, PGDF-BB, and VEGF), in the plasma of patients and healthy controls was performed using a commercial kit (Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex Immunoassay, BioRad) and a Luminex[™] Instrumentation System (Bio-Plex Workstation from Bio-Rad Laboratories). The test was performed using 50 μL of plasma from all study subjects, according to the manufacturer's instructions. Analyte concentrations were calculated using the software provided by the manufacturer (Bio-Plex Manager Software).

Statistical Analysis

Differences in log₂ cytokine levels between ZIKV-infected subjects and healthy controls were assessed using limma (23) with a significance level of $p < 0.05$ and a fold-change > 2 . Additionally, we used Mann–Whitney non-parametric analysis and rank product analysis (24) to compare the levels of plasma cytokines between ZIKV-infected subjects and healthy controls, and Chi-square tests to compare the detection frequency of each cytokine in ZIKV-infected subjects and healthy controls. The Spearman correlation test ($p < 0.05$ and $R > 0.5$) was used to identify

associations between different cytokines/chemokines. To identify associations between cytokine levels and symptoms, we used Student's *t*-test (p -value < 0.05 and fold-change > 2) to compare infected patients with and without specific symptoms. Random Forest analysis (25) was utilized to classify the importance of cytokines in predicting ZIKV infection and clinical symptoms (R package “randomForest”). The Wilcoxon matched-pair test was used to compare cytokine plasma levels in the same subjects in the acute and recovery phases (p -value < 0.05). We used GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), R packages “heatmap2,” “corrplot,” and “ggplot” and Cytoscape² to display the results.

RESULTS

Acute ZIKV Infection Induces Changes in Only Seven Cytokines/Chemokines

To characterize early immune activation during acute ZIKV infection, we compared the plasma levels of cytokines, chemokines, and growth factors between 36 ZIKV-infected subjects and 28 healthy subjects. IP-10 ($p < 0.0001$) showed the highest levels in infected individuals compared to healthy subjects, followed by RANTES ($p < 0.0001$), IFN- γ ($p = 0.02$), IL-9 ($p = 0.03$), IL-7 ($p = 0.005$), IL-1ra ($p < 0.0001$), and IL-5 ($p = 0.01$; **Figures 1A,B** and **2A**). We also tested the differences in cytokine plasma levels between infected patients and healthy subjects by rank product testing (24). Using this approach, the levels of three cytokines were higher in patients with infection: IP-10 ($p < 0.001$), RANTES ($p < 0.001$), and IFN- γ ($p < 0.03$). This confirmed the importance of these three cytokines in acute ZIKV infection.

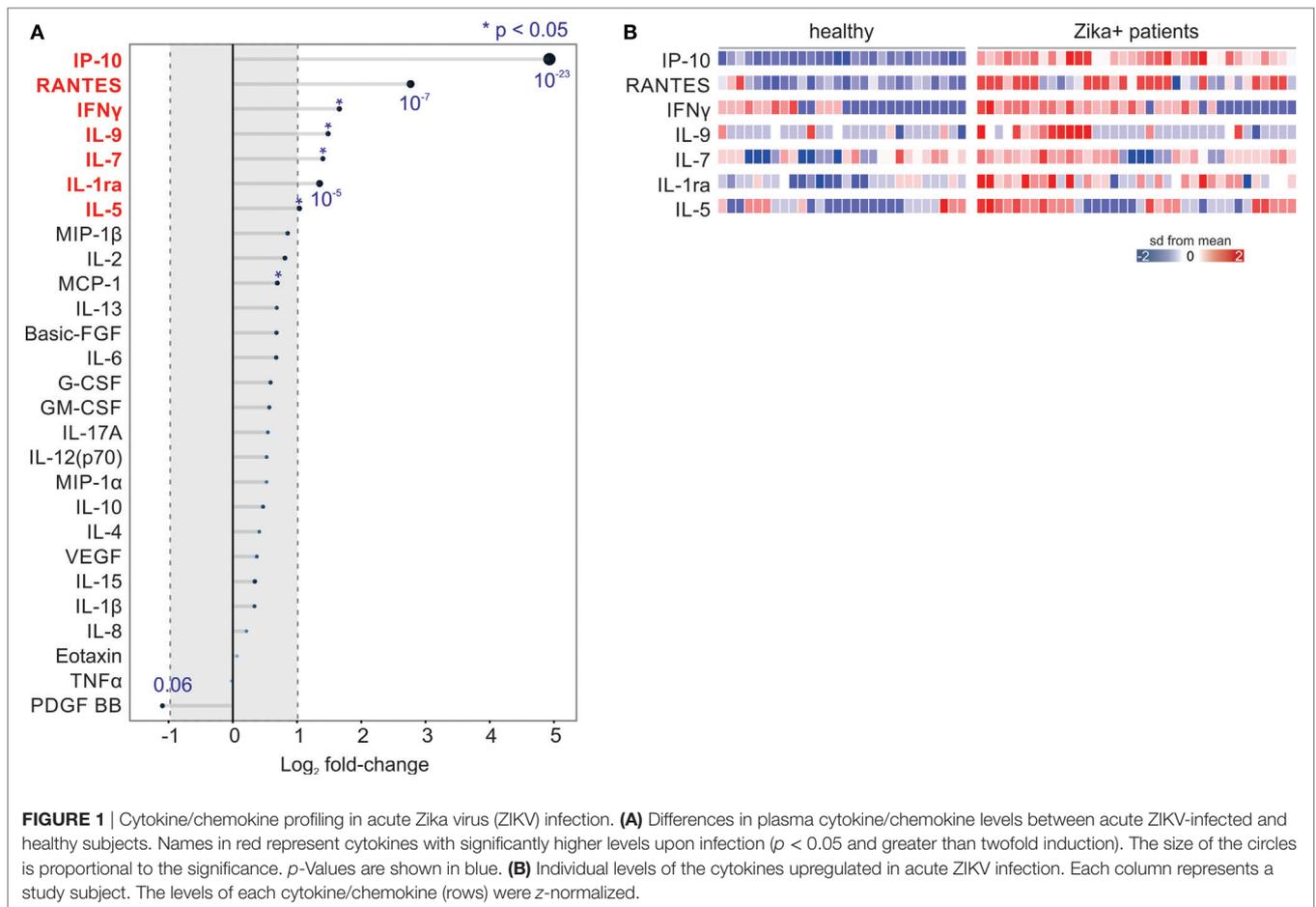
Only five cytokines were more frequently detected in ZIKV-infected subjects compared to healthy controls, namely IL-1ra ($p = 0.01$), IL-2 ($p = 0.03$), IL-9 ($p = 0.03$), IL-15 ($p = 0.02$), and IFN- γ ($p = 0.01$). In contrast, PDGF-BB was more frequently detected in healthy subjects than in ZIKV-infected individuals ($p = 0.02$; **Figure 2B**). A similar pattern was observed when we calculated the frequencies of cytokine detection based on curve values, rather than on the detection limit of each cytokine. In this more stringent analysis, the frequency difference of IFN- γ was no longer significant, whereas IL-5 and IL-7 showed higher frequency of detection in acute ZIKV infection in relation to the normal physiological state (**Figure 2C**). We confirmed the Luminex assay with enzyme-linked immunosorbent assays for IFN- γ and IL-10 (Figure S1 in Supplementary Material). Finally, we found no correlations between ZIKV RNAemia levels and cytokine or chemokine plasma levels (data not shown).

Cytokine and Chemokine Level Correlations in the Plasma of Acute ZIKV-Infected Subjects

We next tested whether the plasma levels of individual cytokines in subjects with acute ZIKV-infection were related. We compared the levels of all cytokines with each other, and constructed a network

¹<https://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-safety.html> (Accessed: February 20, 2018).

²<http://www.cytoscape.org/> (Accessed: November 10, 2017).



representing these associations (**Figure 3**). Increased levels of IL-6 were associated with higher levels of IL-15, MIP-1 α , IL-9, IL-2, IFN- γ , and PDGF-BB. IL-2 levels were correlated with the levels of MCP-1, PDGF-BB, MIP-1 α , IL-9, and IL-15. MIP-1 α strongly correlated with IL-9, followed by IL-17A and eotaxin. MIP-1 β correlated with IL-17A. We also observed a direct correlation between the levels of MIP-1 β and PDGF-BB, although the later has lower levels in infected individuals compared to healthy subjects. Moreover, TNF- α correlated with VEGF, IL-1 β , and IL-4. Eotaxin levels were correlated with MIP-1 α , IL-17A, VEGF, and IL-7. These associations show potential synergic effects of these cytokines, chemokines, and growth factors during acute ZIKV infection.

Associations Between Cytokine/Chemokine Levels and Clinical Symptoms

The clinical symptoms of ZIKV-infected subjects during the acute phase are represented in a heat map in **Figure 4A**. The most frequent clinical symptoms observed were exanthema (80.5%), headache (58.3%), myalgia (50%), arthralgia (47.2%), fever (47.2%), hyperemia (33.3%), swelling (30.5%), itching (25%), and nausea (19.4%). All other symptoms were categorized as “other” (36.1%). No correlation between the number of symptoms and ZIKV RNAemia was observed (**Figure 4A**).

Zika virus-infected subjects who reported headaches showed higher plasma levels of TNF- α , IL-17A, IL-2, IL-9, IL-12p70, MIP-1 α ,

G-CSF, GM-CSF, and VEGF, and significantly higher levels of IL-5 ($p = 0.0015$; **Figure 4B**) compared to those without headache. Those with nausea showed higher plasma levels of IL-5, IL-12p70, IL-8, and PDGF-BB compared to those without nausea. Additionally, ZIKV-infected subjects with arthralgia showed higher levels of IL-1ra, whereas those with hyperemia showed lower plasma levels of IL-6, IL-7, and VEGF (**Figure 4B**). Finally, the plasma levels of G-CSF were significantly lower in ZIKV-infected subjects with fever than in those without fever ($p = 0.0497$; **Figure 4B**).

We also used the Random Forest method (25) to assess the power of plasma cytokine levels to predict Zika symptoms. This method generates the predictive importance of each cytokine in classifying patients with or without a specific symptom. Using a mean decrease of Gini index > 1.5 , we constructed a network showing the associations between cytokine levels and symptoms (**Figure 5**). IP-10 was strongly associated with exanthema, swelling, myalgia, arthralgia, and fever. Headache was predicted mainly by IL-5 and to a lesser extent by MIP-1 β , while arthralgia was predicted by IL-1ra and IL-7. G-CSF predicted fever, and IL-13 and IP-10 and IL-13 and IP-10 also predicted myalgia (**Figure 5**).

Cytokine Changes in the Acute and Recovery Phases

To investigate whether cytokine, chemokine, and growth factor levels were altered during the recovery phase of ZIKV

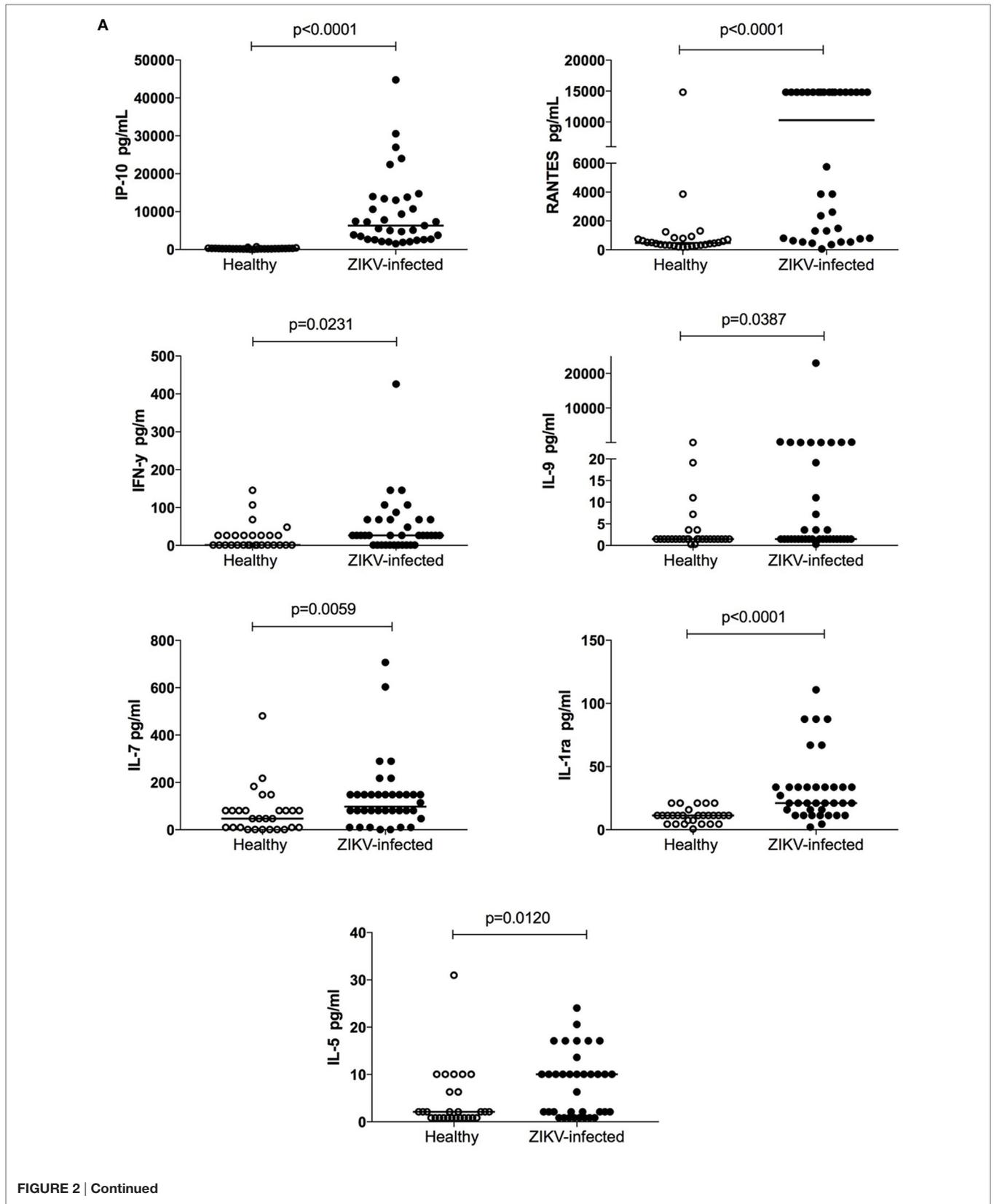


FIGURE 2 | Continued

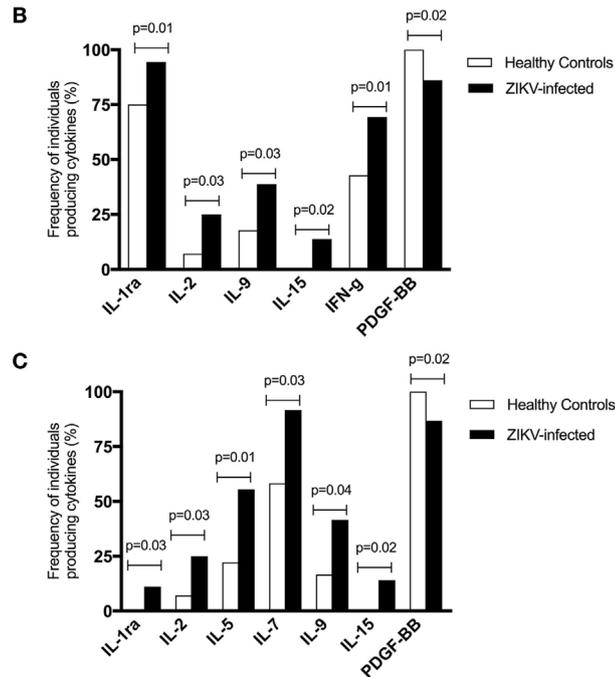


FIGURE 2 | Plasma concentration and frequency of differentially expressed cytokines in acute Zika virus (ZIKV)-infected individuals compared to healthy controls. **(A)** Cytokines measured in the plasma of acute ZIKV-infected individuals and healthy controls and the concentrations of differentially expressed cytokines are shown. The dots on the graphs represent individuals. *p*-Values are indicated at the top of each graph. The non-parametric Mann–Whitney test was used and considered significant when *p* < 0.05. The cytokine frequencies of ZIKV-infected individuals and healthy controls showed significant differences considering the limit of detection of the test **(B)** and based on the standard curve range **(C)**. Chi-square tests were used **(B,C)** and *p* < 0.05 was considered significant.

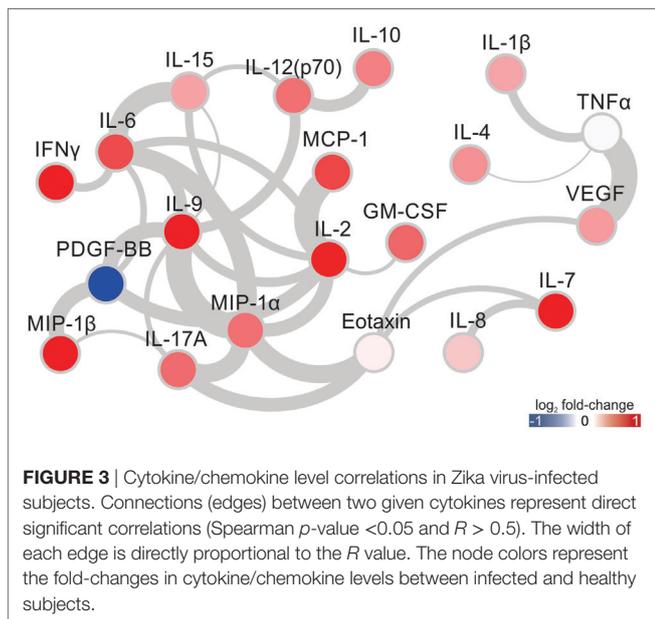


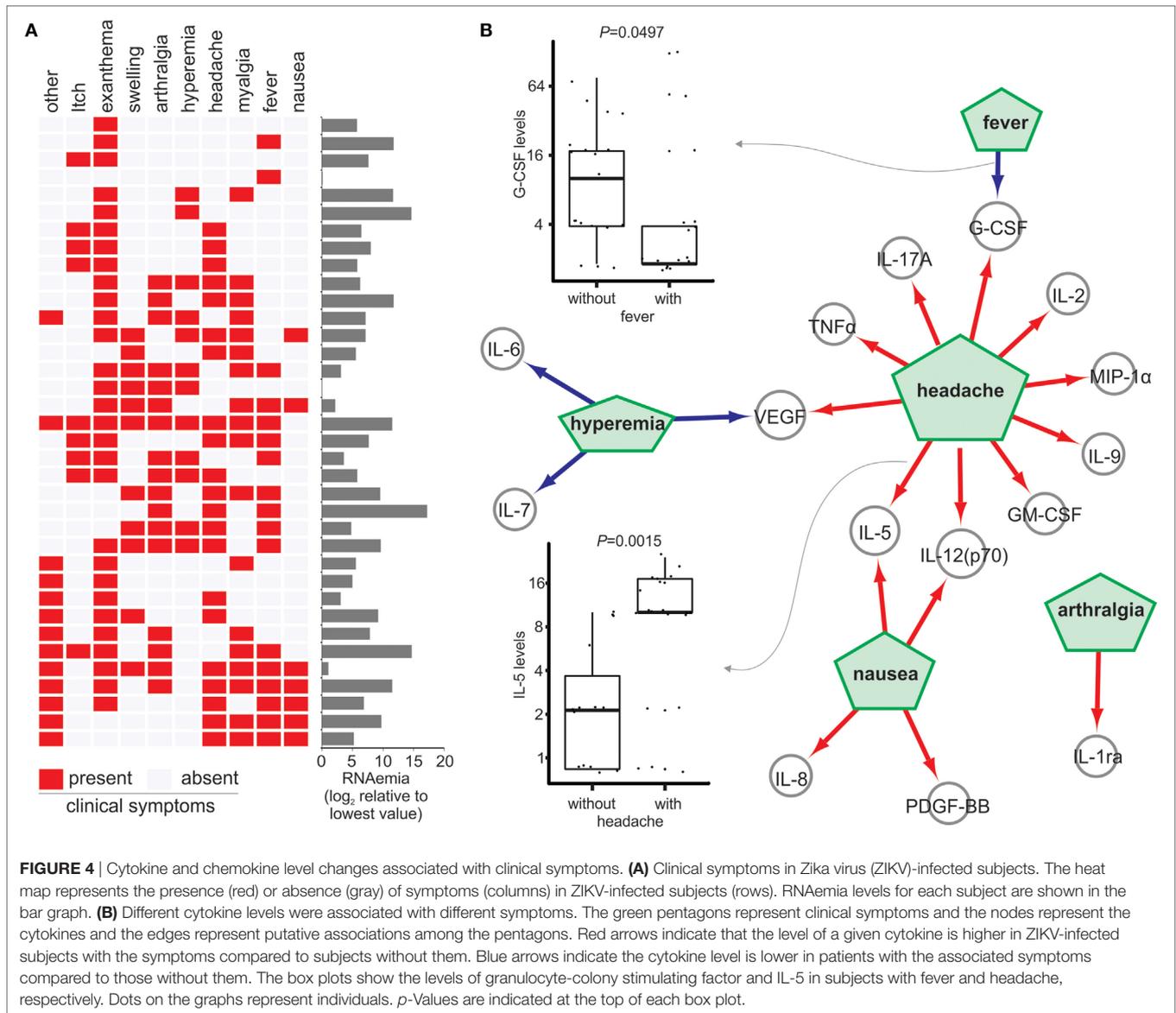
FIGURE 3 | Cytokine/chemokine level correlations in Zika virus-infected subjects. Connections (edges) between two given cytokines represent direct significant correlations (Spearman *p*-value < 0.05 and *R* > 0.5). The width of each edge is directly proportional to the *R* value. The node colors represent the fold-changes in cytokine/chemokine levels between infected and healthy subjects.

infection, we collected blood from six individuals 2–3 weeks after symptom onset. We then compared the cytokine levels in this group during acute and recovery phases, as well as with healthy controls. However, only IP-10 showed significantly lower levels in the recovery phase compared to the acute phase (*p* < 0.05,

Figure 6A). Additionally, comparing the cytokine levels during acute or recovery phases of ZIKV-infected subjects with the levels in healthy controls, we observed decreases in IP-10, RANTES, IFN-γ, IL-9, IL-7, IL-1ra, and IL-5 in the recovery phase, and increases in IL-12-p70 and basic FGF (**Figure 6B**).

DISCUSSION

We aimed to determine the profile of systemic immune activation during acute ZIKV infection in residents of an endemic area and determine whether different symptoms were related to differential levels of specific cytokines/chemokines. We found that acute ZIKV infection induces a quite modest systemic immune activation, involving both proinflammatory and immunoregulatory cytokines and chemokines, compared to the healthy physiological state. It was surprising that out of 27 immune-active molecules studied, only 7 (26%) showed higher levels or detection frequencies in acute ZIKV infection, indicating that only a few of these molecules were dominantly mobilized. Cytokines and chemokines with higher levels during acute ZIKV infection were IP-10, RANTES, IFN-γ, IL-9, IL-7, IL-1ra, and IL-5, involving innate and adaptive immune responses. These cytokines have diverse functional patterns such as Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-5), and Th9 (IL-9) cells, suggesting the activation of these T helper lymphocyte subsets in acute ZIKV infection. Other possible sources of chemokines and cytokines involved in early ZIKV infection are monocytes, dendritic cells, natural killer cells, and innate

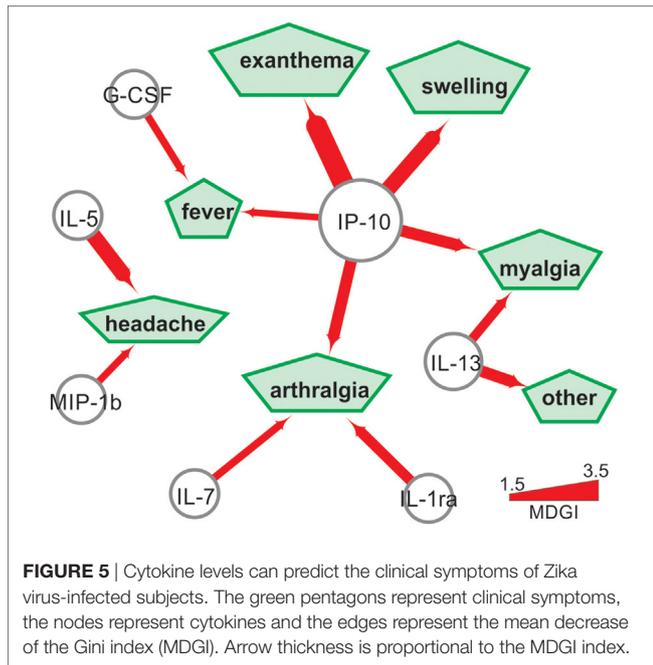


lymphocyte cells. Additionally, the higher levels of homeostatic/immunoregulatory cytokines, namely IL-7 and IL-1ra, indicate the simultaneous mobilization of immune molecules controlling inflammation.

Although the levels of only three dominantly pro-inflammatory molecules, IFN- γ , IP-10, and RANTES, were significantly higher in acute ZIKV infection in the endemic area, they appear to be sufficient for generating an effective antiviral response (26–28), once the subjects usually present viral clearance, at least in the peripheral blood and urine (29). These cytokines are closely related to each other, suggesting common pathways and synergic effects (30–32). Similar to our results, Kam et al. (33) found higher plasma levels of IFN- γ and IP-10 in acute ZIKV-infected subjects from another endemic area than in non-infected controls, reinforcing that ZIKV induces the production of these cytokines that can promote antiviral response and consequently a mild disease.

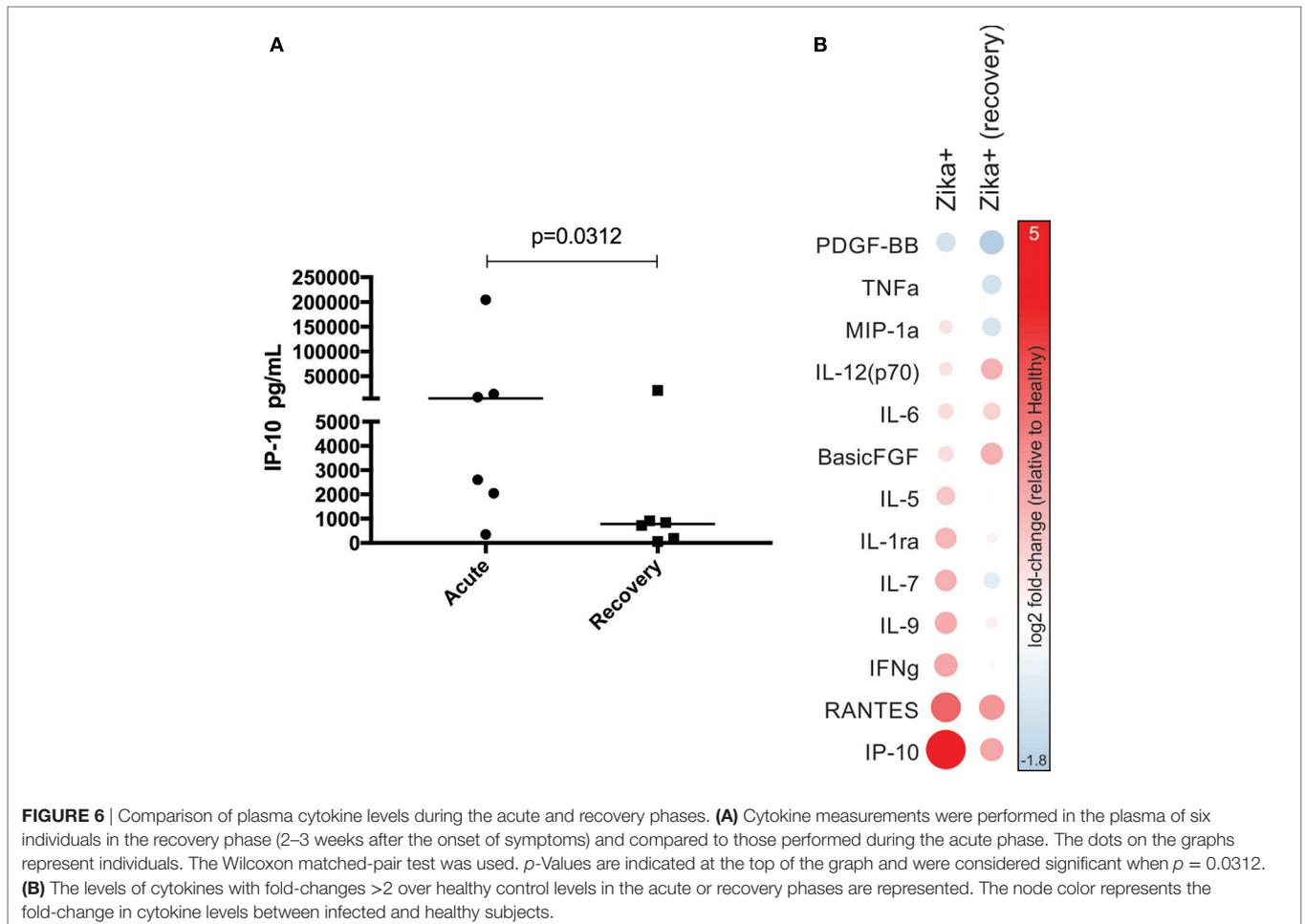
As monocytes are a significant source of IP-10 and RANTES in the peripheral blood, they are likely to be involved in early stage of infection. Recently, it has been shown *in vivo* and *in vitro* that blood monocytes, especially the CD14+CD16+ (intermediate) and CD14lowCD16+ (non-classical) subsets, are the primary ZIKV-infected cells in human blood (19, 20). It is believed that once activated, infected monocytes produce cytokines and migrate to different tissues promoting virus dissemination and most likely establishing virus reservoir.

Interestingly, in our study, the levels of IP-10 decreased in the recovery phase, time when usually the viremia is undetectable in plasma and urine (29). It is, therefore, possible that the higher levels of IP-10 reflect the presence of the virus in the peripheral blood or even in tissues or hidden reservoirs. However, whether IP-10 only controls the viral replication or also participates in immunopathogenesis of ZIKV infection is not yet known. Further studies are necessary to clarify the role of IP-10 in ZIKV infection. It is noteworthy



that the excess of inflammatory responses can also play a deleterious role in clinical manifestations. Accordingly, our data show that IP-10 was strongly associated with exanthema, which occurs during the viremia. Consistently, high levels of IP-10 and IFN- γ have been shown to be involved in non-IgE-mediated hypersensitivity reactions, such as maculopapular exanthema (34, 35).

Headaches in ZIKV-infected individuals were associated with the presence of increased plasma TNF- α , IL-17A, IL-2, IL-9, IL-12p70, MIP-1 α , G-CSF, GM-CSF, and VEGF, as well as significantly higher levels of IL-5, suggesting that these cytokines can play a role in the mechanisms underlying headache. Accordingly, high plasma levels of IL-5 (36), MIP-1 α (37), and RANTES (38) have been reported in migraine sufferers, but their mechanistic contributions are yet to be investigated. Studies on inflammatory mediators in the pathophysiology of headache have shown the main action of IL-5 during migraine episodes (36, 39). Despite increased levels of IL-5 in ZIKV-infected individuals, we observed normal levels of eosinophils and IgE (Figure S2 in Supplementary Material), suggesting that exanthema, the most frequent symptom of our cohort (80.5%), may not involve eosinophils and IgE. This may be related to the day of symptom onset and the severity of the disease. In dengue infection, total IgE serum antibodies showed



increased levels in severe cases starting 7 days after primary dengue infection (40–42). We cannot exclude the possibility that IgE levels increase later in the disease course.

Also interesting was the association between arthralgia and increased production of IL-1ra, a soluble inhibitor of the IL-1 receptor that inhibits the function of IL-1 β , a dominantly proinflammatory cytokine in inflammatory diseases affecting the joints (43). Indeed, IL-1ra production has been observed in arthralgia, probably due to a negative feedback mechanism controlling inflammation (44, 45). Thus, it is likely that in acute-ZIKV infection, IL-1ra plays an immunoregulatory role, controlling inflammation. Fever, the third most reported symptom in acute ZIKV infection, was negatively associated with G-CSF. The mechanism by which G-CSF controls fever is unclear. However, this growth factor is commonly used in cancer patient treatment and consequently decreases fever, suggesting an antipyretic effect (46).

It was quite unexpected that many proinflammatory cytokines/chemokines, such as TNF- α and IL-6, were not significantly higher during acute ZIKV infection in an endemic area, in contrast with other viral infections, such as dengue (47). Our findings also contrast with a report on acute ZIKV infection in six individuals who were not from an endemic area, in which a more striking immunoactivation profile was observed, with higher levels of various inflammatory cytokines/chemokines, including IL-1 β , IL-6, IL-17, MIP-1 α , IP-10, RANTES, IFN- γ , and TNF- α , as well as some immunoregulatory cytokines such as IL-4, IL-10, and IL-13, and IL-2 and IL-9, which display both immunoregulatory and inflammatory functions (21). Although, a diverse profile of cytokines was observed in both studies, this marked difference in global systemic immune activation profile with acute ZIKV infection in residents and non-residents of endemic areas suggests that constant exposure to ZIKV and possibly other environmental factors may affect the immunological inflammatory impact of infection. In this context, it is important to point out that the endemic area of our study has a higher prevalence of arboviruses and relevant index of Yellow Fever vaccination (48, 49). Thus, we hypothesize that the mild ZIKV fever observed in the endemic population may be due to the immune crossreactivity among the arboviruses such as DENV, YFV, and ZIKV. In addition, we raise that this less inflammatory immune profile in our endemic area, though likely to be efficient in systemic virus clearance, could eventually have an unfavorable impact in contexts involving immunoregulatory physiological shift, such as in pregnancy.

In conclusion, our data indicate that acute ZIKV infection in a larger cohort resident to an endemic area displays a modest systemic immune activation profile, involving both proinflammatory and immunoregulatory cytokines and chemokines. Even though these cytokine and chemokines are modestly produced, they are associated with the mostly frequent symptoms such as exanthema, headache, arthralgia, and fever. The mild disease observed in ZIKV-infection can be a result of a balance between pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines that can contribute to virus control and clinical symptom association. Taken together, our results advance the understanding of essential molecules involved in the immunopathogenesis of acute ZIKV infection and highlight the occurrence of a differential immunological profile in ZIKV infection in an endemic area.

ETHICS STATEMENT

Ethical approval for this study was obtained from the Institutional Review Board from Pontifical Catholic University of Goiás (CEP—Research Ethics Committee), under the protocol number 46073815.9.0000.00370. All study subjects signed a written informed consent form before the interview and blood collection in accordance with the Declaration of Helsinki.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SF and IP conceived and designed the study. JB, PS, and RK collected the samples, and JB and PS performed the experiments. PG-D performed the Random Forest analysis. HN analyzed the data using systems biology. SF, IP, VC, HN, JF, and PN wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to all of the subjects that participated in this study. We would like to acknowledge Ana Paula V. Machado, Layena L. S. Ribeiro, Pedro Luiz Paiva, and Oximano S. Dias Neto, who assisted with blood collection and patient interviews, and Robério A. A. Pondé at the Center of Serology and Immunohematology of Goiânia, for his help with the control samples. We also wish to thank the Bioetika Company, Goiânia-GO, for kindly providing the IgE Kit.

FUNDING

This work was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship (to JB), and research fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (to VC and HN). The research leading to these results received funding from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) under grant agreement no. 2013/08216-2 (Center for Research in Inflammatory Diseases—CRID) (to HN).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00821/full#supplementary-material>.

FIGURE S1 | Plasma cytokine concentrations in acute ZIKV-infected individuals compared to healthy controls. IFN- γ (A) and IL-10 (B) levels in the plasma of acute ZIKV-infected individuals and healthy donors were quantified using ELISA. The horizontal lines indicate the medians. The dots on the graphs represent individuals. P-values are indicated at the top of each graph. The non-parametric Mann-Whitney test was used, and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

FIGURE S2 | Quantification of total plasma IgE in ZIKV-infected individuals and healthy controls. Plasma IgE levels were measured using ELISA. (A) IgE levels in ZIKV-infected individuals and healthy controls. The Mann-Whitney test was used for statistical analysis. (B) Stratification according to the day of symptom onset. The Kruskal-Wallis test was performed, and p values were not significant ($p < 0.05$). OD, optical density.

REFERENCES

- Gyawali N, Bradbury RS, Taylor-Robinson AW. The global spread of Zika virus: is public and media concern justified in regions currently unaffected? *Infect Dis Poverty* (2016) 5:37. doi:10.1186/s40249-016-0132-y
- Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Uemura H, et al. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. *Euro Surveill* (2014) 19(4):1–4. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.4.20683
- Pinto Junior VL, Luz K, Parreira R, Ferrinho P. Zika virus: a review to clinicians. *Acta Med Port* (2015) 28:760–5. doi:10.20344/amp.6929
- Oster AM, Brooks JT, Stryker JE, Kachur RE, Mead P, Pesik NT, et al. Interim guidelines for prevention of sexual transmission of Zika virus—United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2016) 65:120. doi:10.15585/mmwr.mm6505e1
- Miner JJ, Sene A, Richner JM, Smith AM, Santeford A, Ban N, et al. Zika virus infection in Mice causes panuveitis with shedding of virus in tears. *Cell Rep* (2016) 20:3208. doi:10.1016/j.celrep.2016.08.079
- Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* (2016) 9:387. doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6
- Mécharles S, Herrmann C, Poullain P, Tran TH, Deschamps N, Mathon G, et al. Acute myelitis due to Zika virus infection. *Lancet* (2016) 387:10026. doi:10.1016/S0140-6736(16)00644-9
- Carteaux G, Maquart M, Bedet A, Contou D, Brugières P, Fourati S, et al. Zika virus associated with meningoencephalitis. *N Engl J Med* (2016) 374:16. doi:10.1056/NEJMc1602964
- Mrakkar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med* (2016) 374:951. doi:10.1056/NEJMoal1600651
- De Araújo TV, Rodrigues LC, Alencar XRA, Barros MFD, Montarroyos UR, Melo AP, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis* (2016) 16:12. doi:10.1016/S1473-3099(16)30318-8
- Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* (2016) 534:267. doi:10.1038/nature18296
- De Noronha LD, Zanluca C, Azevedo MLV, Luz KG, Santos CNDD. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2016) 111(5):287–93. doi:10.1590/0074-02760160085
- Miner JJ, Diamond MS. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe* (2017) 21(2):134–42. doi:10.1016/j.chom.2017.01.004
- Alcendor DJ. Zika virus infection of the human glomerular cells: implications for viral reservoirs and renal pathogenesis. *J Infect Dis* (2017) 216(2):162–71. doi:10.1093/infdis/jix171
- Roach T, Alcendor DJ. Zika virus infection of cellular components of the blood-retinal barriers: implications for viral associated congenital ocular disease. *J Neuroinflammation* (2017) 14(1):43. doi:10.1186/s12974-017-0824-7
- Singh PK, Guest JM, Kanwar M, Boss J, Gao N, Juzych MS. Zika virus infects cells lining the blood-retinal barrier and causes chorioretinal atrophy in mouse eyes. *JCI Insight* (2017) 2(4):e92340. doi:10.1172/jci.insight.92340
- Papa MP, Meuren LM, Coelho SV, de Oliveira Lucas CG, Mustafá YM, Matassoli FL, et al. Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption. *Front Microbiol* (2017) 8:2557. doi:10.3389/fmicb.2017.02557
- Bowen JR, Quicke KM, Maddur MS, O'Neal JT, McDonald CE, Fedorova NB, et al. Zika virus antagonizes type I interferon responses during infection of human dendritic cells. *PLoS Pathog* (2017) 13(2):e1006164. doi:10.1371/journal.ppat.1006164
- Foo SS, Chen W, Chan Y, Bowman JW, Chang LC, Choi Y, et al. Asian Zika virus strains target CD14+ blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nat Microbiol* (2017) 2(11):1558–70. doi:10.1038/s41564-017-0016-3
- Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E. CD14 + CD16 + monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol* (2017) 2(11):1462–70. doi:10.1038/s41564-017-0035-0
- Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarchi L, Rissland J, Ferreira DF, Jaenisch T, et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to reconvalescent phase. *Med Microbiol Immunol* (2016) 205(3):269–73. doi:10.1007/s00430-015-0445-7
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* (2008) 14(8):1232–9. doi:10.3201/eid1408.080287
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies. *Nucleic Acids Res* (2013) 43(7):e47. doi:10.1093/nar/gkv007
- Laing E, Smith CP. RankProdIt: a web interactive Rank Products analysis tool. *BMC Res Notes* (2010) 3:221. doi:10.1186/1756-0500-3-221
- Breiman L. Random Forests. *Machine Learning* (2001) 45:5. doi:10.1023/A:101093340
- Le Page C, Génin P, Baines MG, Hiscott J. Interferon activation and innate immunity. *Rev Immunogenet* (2000) 2:3.
- Glass WG, Rosenberg HF, Murphy PM. Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* (2003) 3(6):467–73. doi:10.1097/01.all.0000104448.09202.91
- Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev* (2011) 22(3):121–30. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.06.001
- Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis* (2015) 21(1):84–6. doi:10.3201/eid2101.140894
- Cassatella MA, Gasperini S, Calzetti F, Bertagnin A, Luster AD, McDonald PP. Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils. *Eur J Immunol* (1997) 27(1):111–5. doi:10.1002/eji.1830270117
- Konno S, Grindle KA, Lee WM, Schroth MK, Mosser AG, Brockman-Schneider RA, et al. Interferon-gamma enhances rhinovirus-induced RANTES secretion by airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2002) 26(5):594–601. doi:10.1165/ajrcmb.26.5.4438
- Fallahi P, Elia G. Interferon- γ -induced protein 10 in Dengue Virus infection. *Clin Ter* (2016) 167(6):e186–91. doi:10.7417/CT.2016.1966
- Kam YW, Leite JA, Lum FM, Tan JLL, Lee B, Judice CC, et al. Specific biomarkers associated with neurological complications and congenital central nervous system abnormalities from Zika virus-infected patients in Brazil. *J Infect Dis* (2017) 216(2):172–81. doi:10.1093/infdis/jix261
- Fernandez TD, Canto G, Blanca M. Molecular mechanisms of maculopapular exanthema. *Curr Opin Infect Dis* (2009) 22(3):272–8. doi:10.1097/QCO.0b013e3283298e62
- Wang F, Cai R, He D, Zhao Y, Ye Y, Zhang X. Serum IFN- γ -inducible chemokines CXCL9 and CXCL10 are elevated in nonimmediate drug hypersensitivity reactions. *Asian Pac J Allergy Immunol* (2016) 34(3):236–41. doi:10.12932/AP0679
- Boćkowski L, Smigielska-Kuzia J, Sobaniec W, Zelazowska-Rutkowska B, Kulak W, Sendrowski K. Anti-inflammatory plasma cytokines in children and adolescents with migraine headaches. *Pharmacol Rep* (2010) 62:287–91. doi:10.1016/S1734-1140(10)70268-1
- Duarte H, Teixeira AL, Rocha NP, Domingues RB. Increased interictal serum levels of CXCL8/IL-8 and CCL3/MIP-1 α in migraine. *Neurol Sci* (2015) 36(2):203–8. doi:10.1007/s10072-014-1931-1
- Domingues RB, Duarte H, Senne C, Bruniera G, Brunale F, Rocha NP, et al. Serum levels of adiponectin, CCL3/MIP-1 α , and CCL5/RANTES discriminate migraine from tension-type headache patients. *Arq Neuropsiquiatr* (2016) 74:626. doi:10.1590/0004-282X20160096
- Munno I, Centonze V, Marinaro M, Bassi A, Lacedra G, Causarano V. Cytokines and migraine: increase of IL-5 and IL-4 plasma levels. *Headache* (1998) 38(6):465–7. doi:10.1046/j.1526-4610.1998.3806465.x
- Koraka P, Murgue B, Deparis X, Setiati TE, Suharti C, Van Gorp E. Elevated levels of total and dengue virus-specific immunoglobulin E in patients with varying disease severity. *J Med Virol* (2003) 70(1):91–8. doi:10.1002/jmv.10358
- Vazquez S, Perez AB, Ruiz D, Rodriguez R, Pupo M, Calzada N. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol* (2005) 33:2. doi:10.1016/j.jcv.2004.10.013

42. Vazquez S, Lozano C, Perez AB, Castellanos Y, Ruiz D, Calzada N. Dengue specific immunoglobulins M, A, and E in primary and secondary dengue 4 infected Salvadorian children. *J Med Virol* (2014) 86(9):1576–83. doi:10.1002/jmv.23833
43. Dayer JM, Oliviero F, Punzi LA. Brief history of IL-1 and IL-1 Ra in rheumatology. *Front Pharmacol* (2017) 8:293. doi:10.3389/fphar.2017.00293
44. Chalan P, Bijzet J, van den Berg A, Kluiver J, Kroesen BJ, Boots AM, et al. Analysis of serum immune markers in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis and in high-risk seropositive arthralgia patients. *Sci Rep* (2016) 6:26021. doi:10.1038/srep26021
45. Cutolo M. IL-1Ra: its role in rheumatoid arthritis. *Reumatismo* (2004) 56:41.
46. Zhu X, Bouganim N, Vandermeer L, Dent SF, Dranitsaris G, Clemons MJ. Use and delivery of granulocyte colony-stimulating factor in breast cancer patients receiving neoadjuvant or adjuvant chemotherapy—single-centre experience. *Curr Oncol* (2012) 19:4. doi:10.3747/co.19.948
47. Restrepo BN, Ramirez RE, Arboleda M, Alvarez G, Ospina M, Diaz FJ. Serum levels of cytokines in two ethnic groups with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg* (2008) 79(5):673–7. doi:10.4269/ajtmh.2008.79.673
48. Maciel IJ, Júnior JBS, Martelli CMT. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. *Revista de Patologia Tropical* (2008) 37:2. doi:10.5216/rpt.v37i2.4998
49. BRASIL – Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (SVS-MS). Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 3, 2018. *Boletim Epidemiológico* (2018) 49:5.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Barros, Silva, Koga, Gonzalez-Dias, Carmo Filho, Nagib, Coelho, Nakaya, Fonseca and Pfrimer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.