

Mariana Oliveira Lopes da Silva

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO FATOR
INIBIDOR DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS NA
PATOGENESE DO VÍRUS ZIKA EM MODELO
EXPERIMENTAL MURINO**



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
JULHO / 2019**

Trabalho realizado no Departamento de Virologia,
do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes,
UFRJ, sob a orientação do(a) Professor(a) Iranaia
Assunção Miranda e co-orientação de Rômulo
Leão Silva Neris.

CIP - Catalogação na Publicação

d586e da Silva, Mariana Oliveira Lopes da
ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO FATOR INIBIDOR DA
MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS NA PATOGÊNESE DO VÍRUS ZIKA
EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO / Mariana Oliveira
Lopes da da Silva. -- Rio de Janeiro, 2019.
49 f.

Orientadora: Iranaia Assunção Miranda.
Coorientador: Rômulo Leão Silva Neris.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. ZIKV. 2. MIF. 3. neuropatogênese. 4.
neuroinflamação. 5. modelo murino. I. Miranda,
Iranaia Assunção, orient. II. Neris, Rômulo Leão
Silva, coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Mariana Oliveira Lopes da Silva**
 DRE: 116071890

BANCA EXAMINADORA: Profa. Juliana Echevarria Lima (Presidente)
 Dr. Luiz Ricardo da Costa Vasconcellos
 MSc. Isis Nem de Oliveira Souza
 Profa. Luciana Barros de Arruda (Suplente)

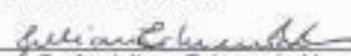
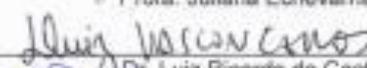
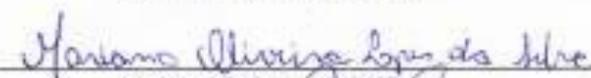
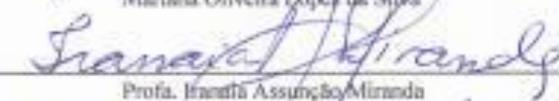
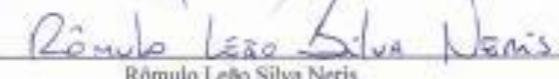
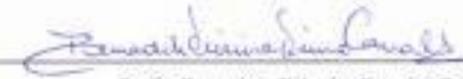
Título da Monografia: **"Estudo do envolvimento do fator inibidor da migração de macrófagos na patogênese do vírus zika em modelo experimental murino"**

Local: Sala Vermelha / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 02 de julho de 2019 às 09:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 02 de ~~julho~~ julho de 2019.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10</u>	 _____ Prof. Juliana Echevarria Lima
<u>10</u>	 _____ Dr. Luiz Ricardo da Costa Vasconcellos
<u>10</u>	 _____ MSc. Isis Nem de Oliveira Souza
	_____ Prof. Luciana Barros de Arruda
Aluno:	 _____ Mariana Oliveira Lopes da Silva
Orientador:	 _____ Profa. Izabela Assunção Miranda
Coorientador:	 _____ Rômulo Leão Silva Neris
Coordenador de TCC	 _____ Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor, carinho e apoio incondicionais que me permitiram chegar até aqui. Obrigado por acreditarem em mim e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus amigos que me acompanham desde a escola e que sempre tornaram meus dias mais divertidos. Obrigado por me apoiarem e ficarem ao meu lado ainda que trilhemos caminhos diferentes.

Aos amigos que a graduação me trouxe, Beatriz, Juliana, Larissa, Letícia, Matheus e Victor, sem vocês não teria sido a mesma coisa. Obrigado por tornarem àquelas tardes que pareciam infinitas mais divertidas e por terem tornado esses anos (puxados) mais alegres!!

Ao meu co-orientador Rômulo e meus colegas de laboratório Daniel e Camila que me acompanharam desde o começo no laboratório. Obrigado por acreditarem e confiarem em mim. Obrigado por serem amigos incríveis e por sempre tornarem os dias mais divertidos.

À minha orientadora, Prof^a Iraniaia, que me recebeu como sua aluna e me guiou durante esses anos. Obrigado por todos os ensinamentos e pela confiança!!

Obrigado a UFRJ e ao IMPG pela locação e apoio técnico e por terem sido minha segunda casa durante estes anos. Aos professores por todos os ensinamentos e aos funcionários pelo apoio técnico.

Obrigado ao CNPq e à FAPERJ por terem financiado esta pesquisa.

RESUMO

Mariana Oliveira Lopes da Silva

ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO FATOR INIBIDOR DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS NA PATOGÊNESE DO VÍRUS ZIKA EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO

Orientadora: Iranaia Assunção Miranda

Co-orientador: Rômulo Leão Silva Neris

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus Zika (ZIKV) é um flavivírus geralmente transmitido pela fêmea de mosquitos *Aedes aegypti*, mas também é possível a transmissão sexual e vertical. A infecção normalmente causa um quadro febril brando, porém pode resultar em complicações neurológicas graves como a síndrome de Guillain-Barré em adultos, microcefalia fetal e outras má formações congênitas. O ZIKV apresenta um marcante neurotropismo, promovendo destruição de células neurais e uma intensa resposta inflamatória no cérebro. O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina produzida por vários tipos celulares e relaciona-se positivamente com a gravidade de várias doenças inflamatórias, incluindo as de natureza viral, como a encefalite causada pelo vírus do Nilo ocidental (WNV) e a dengue hemorrágica. Além disso, níveis elevados de MIF foram encontrados no plasma de fêmeas de macaco rhesus infectadas pelo ZIKV. Nossa hipótese é de que, assim como na infecção pelo WNV, o MIF poderia contribuir para a exacerbação do dano tecidual induzido pelo ZIKV. O objetivo deste estudo foi investigar o envolvimento do MIF na patogênese do ZIKV. Para isso utilizamos um modelo neonatal murino onde a replicação ativa do ZIKV no cérebro promove alterações histológicas como surgimento de áreas de necrose e infiltrado de células inflamatórias. Camundongos C57BL/6, selvagens (WT) e deficientes de MIF (MIF^{-/-}) foram infectados pela via subcutânea com 10⁶ ou 10⁴ PFU de ZIKV ou Mock (50 µl) no terceiro (P3) ou sexto (P6) dias após o nascimento. Nas análises da expressão do MIF no cérebro dos WT infectados, observamos que sua expressão foi modulada de forma dose e idade dependente estando aumentado nos animais mais jovens. Para observar se a ausência do MIF protegeria os animais da infecção, infectamos e monitoramos camundongos WT e MIF^{-/-}. Nossos resultados mostram que na infecção em P3 os animais WT, com ambas cargas virais, apresentaram sinais de distúrbios neurológicos e

motores e evoluíram à morte, enquanto nos MIF^{-/-} isto só foi observado nos animais que receberam a maior carga viral e os que foram infectados com 10⁴ PFU não apresentaram quaisquer sinais clínicos da infecção. Na infecção em P6 nenhum dos grupos apresentou sinal clínico. Ao analisarmos a carga viral no cérebro destes animais observamos todos os grupos apresentavam RNA viral no cérebro e sem diferenças significativas entre WT e MIF^{-/-}, exceto nos animais infectados com 10⁴ PFU onde os MIF^{-/-} mantiveram a carga viral próxima entre 6 e 12 d.p.i. enquanto nos WT foi observado um aumento entre estes dias. Na avaliação da carga viral em órgãos periféricos (músculo, fígado e baço), observamos que o vírus chega em todos eles porém com carga viral muito menor em relação a do cérebro e sem diferenças significativas entre os grupos. Por fim, ao observamos a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, na infecção em P3 com 10⁶ PFU, vimos que ambas estão muito aumentadas em ambos os grupos sem diferenças significativas entre eles. Estes resultados sugerem que a ausência do MIF tem papel protetor em modelo de infecção sub-letal.

Palavras chave: ZIKV, MIF, neuropatogênese, neuroinflamação, modelo murino

ABSTRACT**Mariana Oliveira Lopes da Silva****STUDY OF THE INVOLVEMENT OF THE MACROPHAGE MIGRATION
INHIBITOR FACTOR IN ZIKA VIRUS' PATHOGENESIS IN NA
EXPERIMENTAL MICE MODEL****Advisor: Iranaia Assunção Miranda****Co-advisor: Rômulo Leão Silva Neris**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The Zika virus (ZIKV) is a flavivirus usually transmitted by the female *Aedes aegypti* mosquito, but sexual and vertical transmission is also possible. The infection usually causes mild fever, but may result in severe neurological complications such as Guillain-Barré syndrome in adults, fetal microcephaly and other congenital malformations. ZIKV has marked neurotropism, promoting destruction of neural cells and intense inflammatory response in the brain. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a cytokine produced by several cell types and is positively related to the severity of various inflammatory diseases, including viral ones such as West Nile virus (WNV) encephalitis and hemorrhagic dengue. In addition, elevated levels of MIF were found in the plasma of rhesus monkeys infected by ZIKV. Our hypothesis is that, as in WNV infection, MIF could contribute to the exacerbation of tissue damage induced by ZIKV. The aim of this study is to investigate the involvement of MIF in ZIKV pathogenesis. For this we used a neonatal murine model in which the active replication of ZIKV in the brain promotes histological changes such as the appearance of areas of necrosis and infiltration of inflammatory cells. The wild-type C57BL/6 (WT) and MIF-deficient (MIF^{-/-}) mice were infected with either 10⁶ or 10⁴ PFU of ZIKV or Mock (50 µl) on the third (P3) or sixth (P6) days after birth. In the analyzes of MIF expression in the brain of the infected WT, we observed that its expression was dose and age dependent being increased in the younger animals. To observe if the absence of MIF would protect the animals from the infection, we infected and monitored WT and MIF^{-/-} mice. Our results show that in the P3 infection the WT animals, with both viral loads, presented signs of neurological and motor disorders and evolved to death, while in the MIF^{-/-} this was only

observed in animals that received the highest viral load and those that were infected with 10^4 PFU did not show any clinical signs of infection. In the P6 infection, none of the groups presented clinical signs. When we analyzed the viral load in the brains of these animals we observed all groups had viral RNA in the brain and had no significant differences between them, except in the animals infected with 10^4 PFU where the MIF^{-/-} maintained the viral load between 6 and 12 dpi while in WT an increase was observed between these days. In the evaluation of the viral load in peripheral organs (muscle, liver and spleen), we observed that the virus arrives in all of them but with a viral load much lower than that of the brain and without significant differences between the groups. Finally, when we observed the expression of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6, in the P3 infection with 10^6 PFU, we saw that both are greatly increased in both groups without significant differences between them. These results suggest that the absence of MIF plays a protective role in the sublethal infection model.

Key words: ZIKV, MIF, neuropathogenesis, neuroinflammation, mice model.

Sumário

1- INTRODUÇÃO	1
1.1-O vírus Zika	1
1.2- Estrutura e ciclo de replicação do ZIKV	2
1.3- Manifestações clínicas da infecção pelo ZIKV	4
1.4- Patogênese do ZIKV	5
1.5- Fator inibidor da migração de macrófagos	11
2- JUSTIFICATIVA	14
3- OBJETIVOS	15
3.1- Objetivo geral	15
3.2-Objetivos específicos	15
4- METODOLOGIA	15
4.1- Modelo animal	15
4.2- Propagação do estoque de ZIKV	16
4.3- Quantificação de RNA viral	17
4.4- Quantificação da expressão de citocinas	17
4.5- Análise estatística	18
5- RESULTADOS	18
5.1- A infecção pelo ZIKV induz aumento na expressão de MIF no cérebro de maneira dependente da carga viral e da idade.	18
5.2- A infecção pelo ZIKV induziu perda de peso e elevada letalidade nos camundongos WT mas não nos MIF^{-/-} em modelo de infecção subletal.	19
5.3- A ausência do MIF não interferiu na disseminação viral nos animais infectados, porém atua na capacidade dos mesmos de controlar a infecção no modelo com a menor carga.	22
5.4- A infecção pelo ZIKV aumenta a expressão de TNF-α e IL-6 no cérebro de camundongos	24
6- DISCUSSÃO	26
7- CONCLUSÕES	30
8- REFERÊNCIAS	31

1- INTRODUÇÃO

1.1-O vírus Zika

O Vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus pertencente a família *Flaviviridae* e, do gênero *Flavivirus*, que foi isolado pela primeira vez em 1947 do soro de um macaco rhesus sentinela na região da floresta de Zika, Uganda (Dick, Kitchen et al. 1952). No ano seguinte foi isolado de mosquitos da espécie *Aedes africanus* levando a hipótese de que o vírus seria transmitido por vetor artrópode por mosquitos do gênero *Aedes* (Dick, Kitchen et al. 1952). Os primeiros casos de infecção em humanos confirmados só foram registrados anos mais tarde, em 1962, na Uganda. Porém, mesmo sabendo-se que o vírus infecta humanos, o ZIKV raramente era investigado como possível agente etiológico em um paciente, visto que a região já era endêmica para outras arboviroses com sintomas semelhantes. Até então, a mais conhecida era a dengue, levando a subestimação do real número de casos em um longo período de tempo (Baud, Gubler et al. 2017).

Em 2007, houve o primeiro grande surto registrado de Zika na ilha de Yap, nos Estado Federados da Micronésia seguido, 6 anos mais tarde entre 2013 e 2014, por um surto maior ainda na Polinésia Francesa. Neste momento foram registrados os primeiros casos de síndrome de Guillain-Barré (SGB) em pacientes que tiveram Zika levantando as primeiras suspeitas da capacidade do ZIKV de induzir complicações neurológicas (Cao-Lormeau, Blake et al. 2016).

No Brasil, suspeita-se que o vírus tenha chegado durante a Copa do Mundo de 2014, quando houve a chegada de um grande número de turistas, inclusive africanos e da Polinésia, que podem ter trazido o vírus para território nacional e, possivelmente, espalhando por toda a América do Sul (Epelboin, Talaga et al. 2017). Entre fevereiro e março de 2015, foi registrado um grande número de casos da doença no Brasil. Já em novembro houve um aumento significativo no número de casos de microcefalia, especialmente na região nordeste e, após investigações, observou-se que muitas das grávidas haviam apresentado doença com sintomas “semelhantes aos da dengue”, apresentando febre baixa, dores de cabeça e exantema (De Carvalho, De Carvalho et al. 2016). Em 2016, o ZIKV foi detectado, sequenciado e isolado do líquido amniótico, do cérebro e da placenta de fetos com microcefalia de mulheres grávidas da região nordeste

que haviam apresentado quadro exantemático, provando que o vírus é capaz de atravessar a barreira transplacentária e confirmando as suspeitas de transmissão vertical e que esta poderia ser a causa das complicações neurológicas dos recém-nascidos (Calvet, Aguiar et al. 2016, Driggers, Ho et al. 2016, Martines, Bhatnagar et al. 2016).

Apesar disso, o ZIKV assim como outros flavivírus patogênicos, como o vírus da dengue (DENV) e o da febre amarela (YFV), tem como principal forma de transmissão mosquitos do gênero *Aedes* (Akoua-Koffi, Diarrassouba et al. 2001, Diallo, Sall et al. 2014). Atualmente, já se sabe que existem outras formas de transmissão do ZIKV, devido ao amplo tropismo tecidual do vírus, que já foi detectado em diversos tecidos e fluidos corporais (sangue, urina, saliva, sêmen, leite materno) com relatos de transmissão sexual, de possíveis transmissões via transfusões sanguíneas em regiões endêmicas da doença e transmissão perinatal (Besnard, Lastere et al. 2014, Musso, Nhan et al. 2014, Gourinat, O'Connor et al. 2015, Musso, Roche et al. 2015, Musso, Roche et al. 2015, Barjas-Castro, Angerami et al. 2016, Mansuy, Dutertre et al. 2016).

No Brasil, as infecções pelo ZIKV permanecem sendo notificadas e, somente em 2018, de acordo com o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, foram relatados 3.984 casos confirmados de zika e 5 óbitos devido a infecção pelo ZIKV confirmados por exame laboratorial por todo o Brasil, sendo a terceira maior incidência dos casos no Rio. O último boletim epidemiológico lançado (BE Vol. 50 Nº 13, 2019) mostrou um aumento no número de casos prováveis de ZIKV em gestantes no Brasil em relação a este mesmo período em 2018.

1.2- Estrutura e ciclo de replicação do ZIKV

A partícula madura do ZIKV é composta de uma cópia do genoma viral o qual é envolvido por um capsídeo proteico formado por múltiplas cópias da proteína do capsídeo. O capsídeo é envolto pelo envelope lipídico (bicamada lipídica proveniente das membranas lipídicas do hospedeiro) e este é recoberto por 180 cópias de proteína E e proteína M organizadas em dímeros que ocupam toda a sua superfície, conferindo arranjo icosaédrico à partícula (figura 1) (Kuhn, Zhang et al. 2002, Sirohi, Chen et al. 2016).

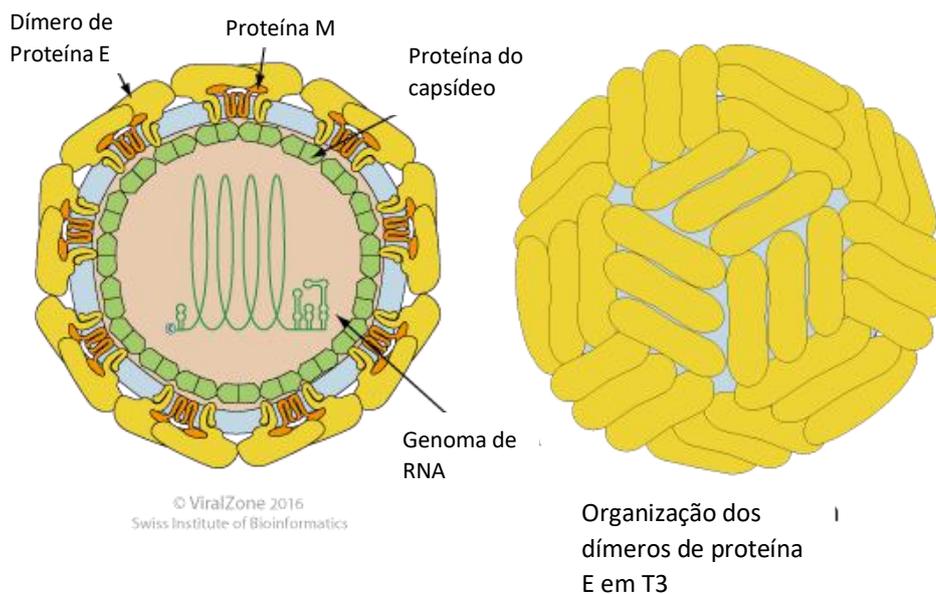


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do ZIKV. À direita estrutura tridimensional da partícula viral que possui simetria icosaédrica com aproximadamente 50 nm de diâmetro. À esquerda esquema da estrutura do vírus mostrando o nucleocapsídeo circundado por um envelope lipídico onde são projetadas as proteínas E e M. Fonte: *viralzone.expasy.org* – Zika vírus.

O genoma do ZIKV consiste de uma fita-simples de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 10.7 Kb, com apenas um quadro de leitura (*Open Reading Frame* - ORF) que codifica 10 proteínas: 3 estruturais (proteína do capsídeo, precursora de membrana- prM e de envelope- E) e 7 não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Chambers, Hahn et al. 1990). O ciclo de replicação do ZIKV ainda é pouco estudado, logo utiliza-se como base o ciclo de outros flavivírus, onde geralmente diversos aspectos são conservados dentro do gênero. O ciclo inicia-se quando há interação das glicoproteínas do envelope viral com os receptores da célula-alvo levando a endocitose da partícula. Com a acidificação no interior da vesícula endocítica, os dímeros de proteína E formam trímeros, levando a fusão do envelope à membrana da vesícula e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula hospedeira, onde, em seguida, o genoma viral é liberado (Modis, Ogata et al. 2004). Após ser liberado, o mesmo é reconhecido pela maquinaria de tradução celular no retículo, onde ocorre a tradução da poliproteína que é, posteriormente, clivada por proteases virais e do hospedeiro. A replicação do genoma ocorre em complexos de replicação, que são projeções do retículo endoplasmático (R.E.) formando vesículas, onde se tem a transcrição da fita de RNA negativa pela polimerase viral, que serve de

molde para gerar as novas fitas de polaridade positiva. Após a etapa de amplificação, o genoma viral é encapsulado e brota do R.E. seguindo para o complexo de Golgi onde ocorre a maturação da partícula. Nesse momento ocorre a reorganização das proteínas E para formar os dímeros e a prM é clivada para enfim liberação das partículas maduras para o meio extracelular via exocitose.(Routhu and Byrareddy 2017).

1.3- Manifestações clínicas da infecção pelo ZIKV

A infecção pelo ZIKV raramente é sintomática, onde estima-se que apenas 18% das pessoas infectadas apresentam sintomas (De Carvalho, De Carvalho et al. 2016). Nos casos sintomáticos, os pacientes geralmente apresentam sintomas brandos e inespecíficos como febre, exantema, conjuntivite, artralgia e mialgia que duram de alguns dias a uma semana e dificultam bastante um diagnóstico preciso da doença (Duffy, Chen et al. 2009), principalmente considerando que as áreas endêmicas do ZIKV coincidem com as de outros flavivírus como o vírus da dengue (DENV) e o da febre amarela (YFV). (Charlier, Beaudoin et al. 2017, Ruckert, Weger-Lucarelli et al. 2017).

Apesar de na maioria dos casos a infecção não ser grave, já existem inúmeros relatos de complicações neurológicas causadas pelo ZIKV em adultos, como encefalite, meningoencefalite, mielite e desenvolvimento de SGB, além da síndrome congênita do ZIKV (SCZ). Nesses casos, a confirmação da infecção se deu pelo isolamento e/ou detecção do RNA viral no líquido cefalorraquidiano (LCR), soro dos pacientes sintomáticos, e por fim no cérebro, no caso de morte fetal (Cao-Lormeau, Blake et al. 2016, Carteaux, Maquart et al. 2016, Mecharles, Herrmann et al. 2016, Brito Ferreira, Antunes de Brito et al. 2017, da Silva, Frontera et al. 2017, Krauer, Riesen et al. 2017).

A SGB é uma doença autoimune neurodegenerativa onde partes do sistema nervoso periférico se tornam alvo do sistema imune que monta resposta contra a mielina dos axônios e cujo sintomas geralmente consistem em parestesia seguida de fraqueza progressiva e por fim paralisia flácida (Hadden and Hughes 2003). A encefalite e meningoencefalite são caracterizadas por um processo inflamatório no cérebro e cérebro e meninges, respectivamente, que culminam na disfunção do órgão com conseqüente sinais clínicos como problemas cognitivos e paralisia (Venkatesan,

Tunkel et al. 2013). Já a mielite é a inflamação da medula espinal que leva a desmielinização dos axônios gerando um quadro de déficit sensorial e motor e possivelmente dificuldade para andar e respirar podendo evoluir para paralisia completa (Greenberg, Krishnan et al. 2019). Os pacientes que apresentam essas doenças induzidas pelo ZIKV apresentaram sintomas como: dores de cabeça intensas, parestesia, diplegia facial, fraqueza nos membros inferiores e dificuldade ao andar, insuficiência respiratória, confusão mental e perda de consciência (Azevedo, Araujo et al. 2016, Bido-Medina, Wirsich et al. 2018).

A SCZ é um conjunto de anomalias estruturais e funcionais no feto causadas pela infecção congênita pelo ZIKV e que podem levar a morte fetal. Tais anomalias incluem restrição do crescimento intrauterino, morfologia cranial alterada, defeitos oculares, cegueira, surdez, microcefalia, calcificação e atrofia cerebral e do cerebelo (Besnard, Eyrolle-Guignot et al. 2016, Brasil, Pereira et al. 2016, Culjat, Darling et al. 2016, de Fatima Vasco Aragao, van der Linden et al. 2016, Leal, Muniz et al. 2016, Mlakar, Korva et al. 2016, Ventura, Maia et al. 2016). A infecção congênita pelo ZIKV pode ainda levar a manifestações clínicas de meses a anos após o nascimento, em crianças que nasceram com ou sem microcefalia. Crianças que foram expostas ao vírus ainda no útero, mas que nasceram normocefálicas apresentavam malformações no cérebro, como ventriculomegalia, redução da massa encefálica, calcificações subcorticais e microcefalia pós-natal resultando em diversos sinais clínicos como epilepsia e deficiências motoras (Franca, Schuler-Faccini et al. 2016, Moura da Silva, Ganz et al. 2016, van der Linden, Pessoa et al. 2016).

1.4- Patogênese do ZIKV

A patogênese do vírus ainda não é completamente conhecida e devido aos numerosos casos de complicações neurológicas graves decorrentes da infecção pelo ZIKV, existe um grande esforço nos estudos dos mecanismos de patogênese do vírus com foco no contexto neurológico da doença.

Acredita-se que as neuropatias causadas pelo ZIKV são, em parte, decorrentes da morte das células infectadas em conjunto da inflamação robusta induzida pelo vírus no sistema nervoso central (SNC) (de Sousa, Azevedo et al. 2018). Em humanos

adultos já foi descrito que a infecção pelo ZIKV no SNC causa inflamação no mesmo induzindo a formação de infiltrado celular no cérebro e medula espinal causando edema, lesões e síntese de anticorpo (IgM) intratecal além de levar ao aumento no número de leucócitos (pleocitose) e no nível de proteínas no LCR. Imagens de ressonância magnética de pacientes com quadro de encefalite induzida por ZIKV mostram redução da massa cinzenta, edema e lesões em diversas áreas do cérebro (Soares, Brasil et al. 2016, Alves-Leon, Lima et al. 2018).

Além disso, análises histopatológicas pós-morte do cérebro de pacientes mostram necrose neuronal, edema com infiltrado formado principalmente por células mononucleadas e hemorragias (figura 2A-C). Ensaios de imunohistoquímica e imunofluorescência demonstraram uma grande quantidade de antígeno do ZIKV no tecido cerebral, estando frequentemente presentes em corpos neurais e em células apoptóticas (figura 2 D e E) (Azevedo, Araujo et al. 2016, Alves-Leon, Lima et al. 2018).

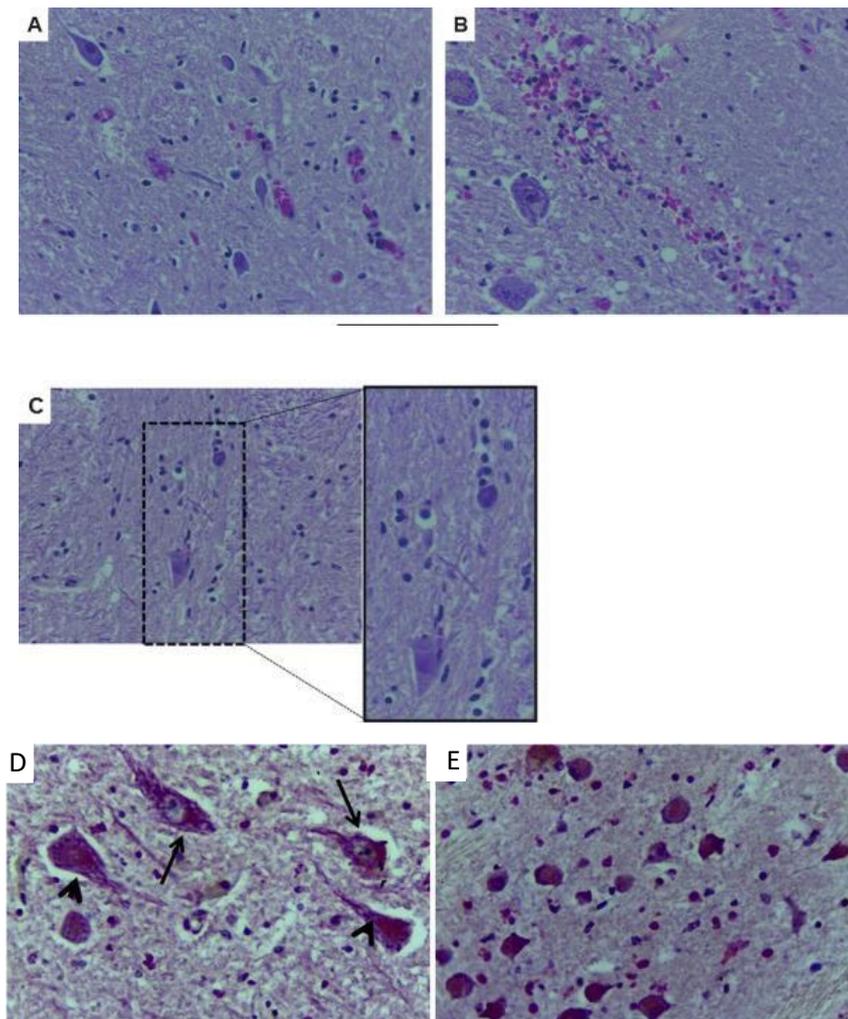


Fig 2: A infecção pelo ZIKV induz danos graves no SNC de humanos adultos. A- Ehistopatologia e imunohistoquímica do cérebro de um paciente de 38 anos que veio a óbito devido a encefalite induzida pelo ZIKV. A-C: cérebro com necrose neuronal, edema e hemorragia perivascular. D e E: cérebro expressando antígeno do ZIKV, especialmente nos corpos neuronais (setas)(D) e células apoptóticas (E) (Azevedo, Araujo et al. 2016)

Nos casos de infecção congênita pelo ZIKV, os fetos/neonatos apresentam histopatologias semelhantes em alguns aspectos a de adultos no cérebro, com edema, infiltrado mononuclear, necrose neuronal e presença de células apoptóticas, além de intensa vasocongestão, hemorragias, presença de infiltrado e áreas de calcificação (figura 3). O RNA viral foi detectado por RT-PCR e o vírus foi isolado em cultura celular e detectado em imunohistoquímica não só no cérebro dos fetos/neonatos como também da placenta, do líquido amniótico, pulmões, coração e rins e todos estes tecidos se mostraram afetados nas histologias, (Driggers, Ho et al. 2016, Azevedo, Araujo et al. 2018).

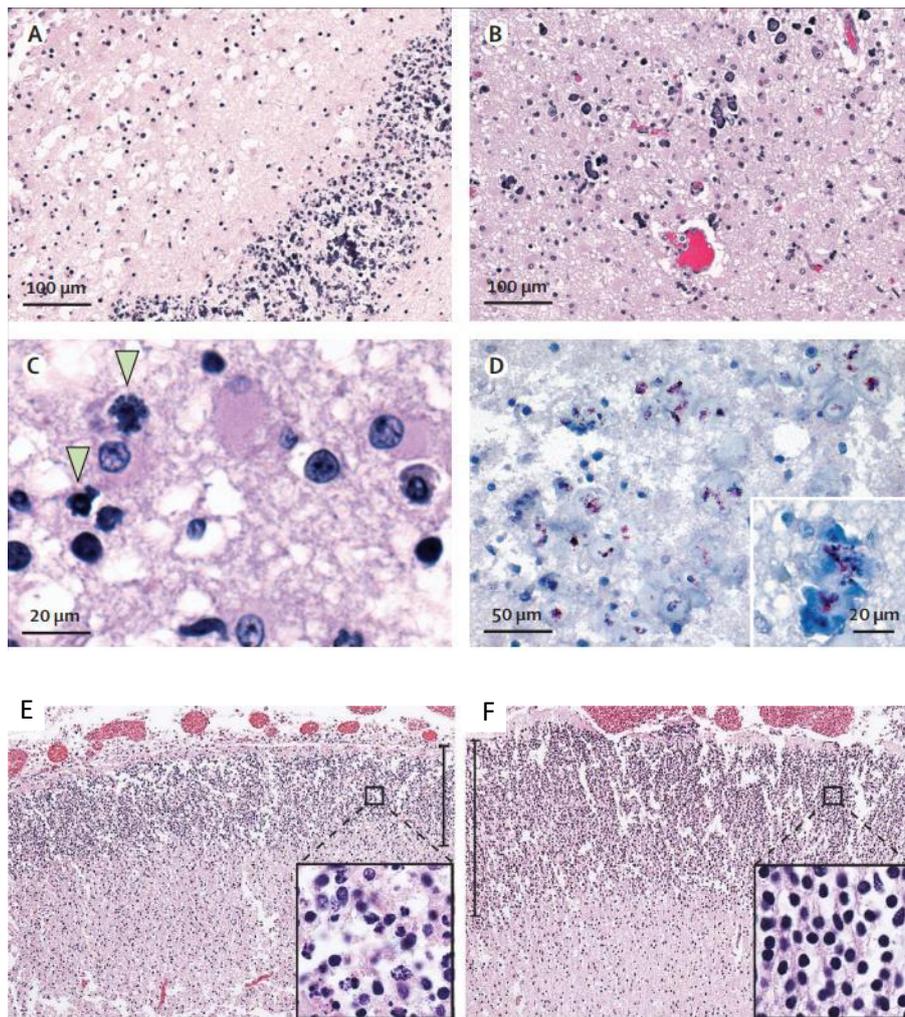


Figura 3: A infecção congênita pelo ZIKV induz danos graves no cérebro de fetos/neonatos humanos. Histopatologias e imunohistoquímica do cérebro de uma menina diagnosticada com microcefalia no 5º mês da gravidez e que morreu com 2 meses de idade. A: cérebro com uma faixa subcortical de células degeneradas associadas à áreas de calcificação. B: áreas de calcificação distribuídas pelo córtex cerebral. C: células neurais degeneradas (setas) no córtex. D: imunohistoquímica marcando antígenos do ZIKV em áreas de calcificação. E e F: histopatologias do cérebro de um feto com diversas anomalias cerebrais e que foi abortado com 21 semanas de gestação. E: córtex parietal com abundantes células necróticas e significativamente mais fino que o córtex occipital (F) que não foi afetado (Martines, Bhatnagar et al. 2016; Driggers, Ho et al. 2016).

A caracterização do infiltrado inflamatório *in situ* no cérebro de crianças que morreram devido a microcefalia induzida pelo ZIKV mostram a presença de diversos tipos celulares como astrócitos, células NK, micróglia (macrófagos M2), linfócitos TCD8+ e TCD4+ e células T reg. Análise do perfil de citocinas presentes no cérebro revelou o aumento de diversas citocinas (IFN- γ , IFN- α , IL-33, IL-6, IL-1 β TGF- β e

TNF- α) que estão envolvidas direta ou indiretamente em diversos processos de morte celular. Estas citocinas provavelmente estão relacionadas a neurotoxicidade associada a infecção pelo ZIKV visto que estavam co-localizadas com áreas de extensa necrose em análises de imunohistoquímica (Azevedo, de Sousa et al. 2018, de Sousa, Azevedo et al. 2018).

Análises do soro de pacientes mostram que a infecção induz o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ e TNF- α . Essas citocinas que estão envolvidas com ativação de células da microglia que quando ativadas liberam produtos que podem levar a danos neuronais. Estas citocinas também atuam no recrutamento de células imunes para os sítios de infecção contribuindo para formação de rupturas na barreira hematoencefálica (BHE) e assim facilitando a infecção (Galliez, Spitz et al. 2016, Kam, Leite et al. 2017, Naveca, Pontes et al. 2018). Níveis elevados destas citocinas já foram relacionados com prognósticos ruins em pacientes infectados pelo vírus da encefalite japonesa (JEV), um outro flavivírus (Winter, Dung et al. 2004). A quimiocina CXCL10 também se mostrou em níveis elevados no soro de pacientes infectados com ZIKV. Níveis elevados desta citocina estão presentes no soro de pacientes com infecções graves por DENV e YFV além de já ter sido descrito que aumento de CXCL10 pode induzir apoptose de neurônios fetais e de estar envolvido na patogênese da SGB (Melchjorsen, Sorensen et al. 2003, Liu, Guo et al. 2011, Chiang and Ubogu 2013)

Experimentos *in vitro* mostram que o ZIKV é capaz de infectar células progenitoras neurais humanas e neurônios imaturos e maduros, ainda que em menor proporção. A replicação do ZIKV nessas células induz autofagia, leva a desregulação do ciclo celular, disfunção mitótica com formação de centrossomos anormais, ativação de caspase-3, 7, 8 e 9 e morte celular levando a depleção de células progenitoras e consequente prejudicando a neurogênese (Souza, Sampaio et al. 2016, Tang, Hammack et al. 2016, Gabriel, Ramani et al. 2017). A infecção viral também é capaz de interferir na diferenciação destas células, impedindo a formação de neuroesferas, um modelo de cultura de células composto por aglomerados flutuantes de células-tronco neurais, ou levando a formação de neuroesferas com morfologias anormais. Também foi mostrado que o vírus é capaz de afetar o desenvolvimento de organoides cerebrais. Essas estruturas são culturas de células-tronco pluripotentes que formam estruturas

tridimensionais mimetizando um cérebro embrionário, e que quando infectados com ZIKV apresentaram crescimento muito reduzido em relação aos controles (Garcez, Loiola et al. 2016).

Modelos experimentais de infecção em camundongos adultos imunocomprometidos (*Infar^{-/-}*, *Irf^{-/-}* 3 *Irf^{-/-}* 5 *Irf^{-/-}* 7) mostram que o ZIKV é capaz de infectar diversos tecidos, estando presente no soro, músculo, fígado, rins, baço, cérebro e medula espinal, causando doença e levando os animais a morte (Lazear, Govero et al. 2016). Histopatologias do cérebro dos animais revelam presença de infiltrado de células inflamatórias, de células apoptóticas e de áreas de necrose (Aliota, Caine et al. 2016, Lazear, Govero et al. 2016, Rossi, Tesh et al. 2016). Modelos de transmissão vertical em camundongos fêmeas imunocomprometidas e macacos mostram que o vírus é capaz de infectar a placenta, causando disfunção placentária, e chegar ao feto levando restrição de crescimento intrauterino, malformações neurológicas graves, semelhantes às encontradas em fetos/neonatos humanos, e aborto (Cugola, Fernandes et al. 2016, Dowall, Graham et al. 2016, Miner, Cao et al. 2016, Adams Waldorf, Nelson et al. 2018, Gurung, Reuter et al. 2019).

A infecção de camundongos neonatos imunocompetentes leva a sinais clínicos e achados patológicos que se assemelham em vários aspectos aos vistos em humanos. Os modelos de infecção em camundongos neonatos não só proporcionam a possibilidade de observar a patogênese do ZIKV em um camundongo imunocompetente, como possibilitam observar os efeitos da infecção na neurogênese *in vivo* visto que a maturidade neuronal do camundongo ao nascer equivale a neurogênese de um feto com 25 semanas de gestação (Semple, Blomgren et al. 2013, Workman, Charvet et al. 2013). Os neonatos infectados pelo ZIKV apresentam perda de peso persistente, tremores, ataxia, paralisia dos membros posteriores, convulsões, problemas cognitivos e morte (Manangeeswaran, Ireland et al. 2016, van den Pol, Mao et al. 2017). O ZIKV chega eficientemente ao SNC destes animais sendo observado em ensaios de imunohistoquímica e de imunofluorescência infectando células progenitoras neurais, neurônios, astrócitos e células da glia. Análises histológicas do cérebro dos animais mostram que a infecção causa danos graves no SNC levando a atrofia do cérebro com extensas áreas de necrose, calcificação, presença de células apoptóticas e de infiltrado

de células inflamatórias (van den Pol, Mao et al. 2017, Nem de Oliveira Souza, Frost et al. 2018).

Além disso, o ZIKV também induz a produção de diversos mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α no cérebro de camundongos neonatos levando a formação de resposta inflamatória robusta que está intrinsecamente ligada aos danos teciduais e aos episódios de convulsões que ocorrem durante a infecção (Nem de Oliveira Souza, Frost et al. 2018). Dois grupos também já demonstraram aumento na produção de citocinas em macacos induzida pela infecção pelo ZIKV, tanto em modelo de infecção intravaginal quanto em infecção subcutânea em fêmeas grávidas. Foi observado níveis elevados de diversas citocinas e quimiocinas como IL-1RA, IL-6, MCP-1, CXCL10 e o MIF tanto no soro das fêmeas infectadas intravaginalmente quanto no soro, líquido amniótico e LCR da mãe e do feto (Gurung, Reuter et al. 2019).

1.5- Fator inibidor da migração de macrófagos

O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) foi uma das primeiras citocinas descritas, como sendo um fator derivado de células T que inibia a migração de monócitos e macrófagos (George and Vaughan 1962). O MIF é uma citocina pró-inflamatória produzida por diversas células além das células T, como as células B, monócitos, macrófagos, células dendríticas, entre outros leucócitos e até mesmo em diversos tecidos e por células não-imunes, como os hepatócitos e células endoteliais (Calandra and Roger 2003).

Estudos mostram que o MIF possui atividade autócrina ou parácrina, participando na modulação da inflamação por atuar no recrutamento de células imunes e induzir a ativação dessas células através da ligação em diversos receptores, como CXCR2, CXCR4 e CD74. Além disso, o MIF tem a capacidade de induzir o aumento da secreção de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12 (Carli, Metz et al. 2009, Howait, Albassam et al. 2019); bem como está envolvido na indução de proliferação celular e angiogênese (figura 4)(Bernhagen, Krohn et al. 2007, Wang, Cen et al. 2017, Jankauskas, Wong et al. 2019).

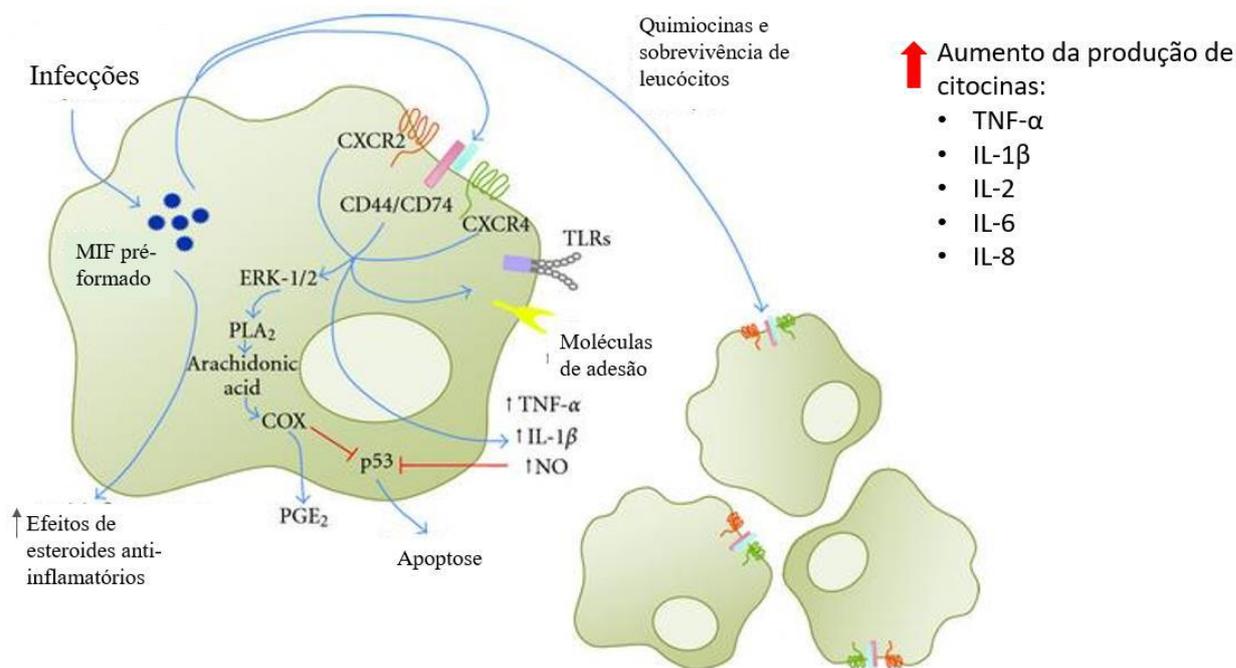


Figura 4: Mecanismo molecular da atividade do MIF. O MIF recém sintetizado ou pré-formado no citoplasma pode ser liberado após determinados estímulos, como por exemplo infecções. O MIF liberado é reconhecido por receptores (CD44/CD74) na própria célula ou em células vizinhas, desencadeando um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-8) e quimiocinas, de moléculas de adesão e atua na sobrevivência de leucócitos (Bozza, Martins et al. 2012).

O MIF vem sendo descrito como uma molécula associada ao desenvolvimento e progressão de diversas doenças causadas por patógenos, doenças inflamatórias, de origem autoimune e na formação de tumores (Lue, Kleemann et al. 2002). Os níveis desta citocina são encontrados significativamente aumentados em pacientes com diversas doenças como glomerulonefrite, aterosclerose, artrite reumatoide, esclerose múltipla, SGB, encefalite induzida pelo vírus do oeste do Nilo (WNV), o vírus da encefalite japonesa (JEV) e o vírus da encefalite transmitido por carrapatos (TBEV), assim como na febre da dengue (FD) e nas formas mais graves da infecção pelo DENV, a febre hemorrágica do DENV (FHD) e a síndrome do choque da dengue (SCD) (Suzuki, Ogata et al. 2000, Arjona, Foellmer et al. 2007, Assuncao-Miranda, Amaral et al. 2010, Zwiech 2015, Kim and Kim 2016, Benedek, Meza-Romero et al. 2017, Grygorczuk, Parczewski et al. 2017, Tilstam, Qi et al. 2017).

Além disso, foi observado que os níveis de MIF estão elevados no soro e LCR de pacientes diagnosticados com SGB na mesma proporção da gravidade da doença

(Shen, Lang et al. 2018). Camundongos com neurite alérgica experimental (NAE), um modelo experimental da SGB, e tratados com anticorpo anti-MIF ou ISO-1 apresentaram sinais clínicos mais brandos e resolução da doença mais rapidamente em relação a camundongos tratados com IgG ou DMSO (Sainaghi, Collimedaglia et al. 2010). Acredita-se que o MIF atua na patogênese da SGB por levar a exacerbação da resposta imune, geralmente após uma infecção, causando superexpressão de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento e ativação de células imunes, especialmente linfócitos e macrófagos, levando ao aumento de permeabilidade da barreira hemato-nervosa (BHN) e desmielinização dos axônios (Shen, Lang et al. 2018).

O MIF também parece ser relevante na progressão de doenças de etiologia viral. Alguns grupos descreveram a importância do MIF na patogênese do DENV, um dos flavivírus mais disseminados no globo. Pacientes infectados pelo DENV apresentam elevados níveis de MIF no soro e isso está positivamente relacionado com a gravidade da doença e morte dos pacientes (Chen, Lei et al. 2006, Assuncao-Miranda, Amaral et al. 2010). Em seguida foi demonstrado que a secreção de MIF é induzida pela proteína viral NS1, e seu aumento tem papel central no aumento de permeabilidade vascular, que é característico das formas mais graves da doença. (Chuang, Su et al. 2012, Chen, Chuang et al. 2016, Chen, Chao et al. 2018).

Em infecções pelo WNV, outro flavivírus que assim como ZIKV é neurotrópico, o MIF aparentemente tem papel importante na disseminação do mesmo até o SNC (Arjona, Foellmer et al. 2007). Pacientes com encefalite induzida pelo WNV apresentavam elevados níveis de MIF no plasma e no fluido cerebrospinal quando comparado ao de pacientes não infectados. Experimentos *in vivo* também mostraram que camundongos MIF^{-/-} ou selvagens tratados com isoxazolona-1 (molécula que se liga ao sítio catalítico do MIF inibe sua atividade) ou anticorpos neutralizantes de MIF quando infectados com o WNV apresentaram maior taxa de sobrevivência, menor carga viral e tinham menos infiltrado inflamatório no cérebro em comparação com o grupo selvagem não tratado. Além disso, o MIF possivelmente facilita a entrada do vírus no cérebro por estar envolvido no aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica durante a infecção (Arjona, Foellmer et al. 2007).

2- JUSTIFICATIVA

O ZIKV é um vírus neurotrópico que está envolvido com diversas complicações neurológicas graves como encefalite e SGB em adultos e a SCZ (Cao-Lormeau, Blake et al. 2016, Carreaux, Maquart et al. 2016, Mecharles, Herrmann et al. 2016, Brito Ferreira, Antunes de Brito et al. 2017, da Silva, Frontera et al. 2017, Krauer, Riesen et al. 2017). Na SCZ, a infecção pode resultar em um amplo espectro de sequelas graves associadas ao comprometimento do sistema nervoso fetal como malformações congênitas, problemas de visão e audição, distúrbios motores e cognitivos, convulsões e morte (Besnard, Eyrolle-Guignot et al. 2016, Brasil, Pereira et al. 2016, Culjat, Darling et al. 2016, de Fatima Vasco Aragao, van der Linden et al. 2016, Leal, Muniz et al. 2016, Mlakar, Korva et al. 2016, Ventura, Maia et al. 2016). Além disso, estudos apontam que em 2017 houve um aumento de complicações neurológicas em adultos relacionadas ao ZIKV no estado do Rio de Janeiro (da Silva, Frontera et al. 2017). Desta forma, a infecção pelo ZIKV pode ser mais grave nos estágios iniciais do desenvolvimento, porém representa um risco em potencial para outros grupos da população.

As manifestações neurológicas causadas pelo ZIKV são decorrentes de um conjunto de fatores que envolvem a extensa morte celular que ocorre não somente diretamente pela infecção viral, mas também pela resposta inflamatória robusta induzida pelo ZIKV, associada a uma produção aumentada de mediadores pró-inflamatórios e recrutamento de células imunes que juntos tem ação neurotóxica durante o curso da infecção (Azevedo, Araujo et al. 2016, de Sousa, Azevedo et al. 2018). Visto isso, nossa hipótese é que o MIF tem um papel importante na patogênese do ZIKV por se tratar de uma citocina pró-inflamatória que está envolvida no aumento de expressão de diversas outras citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12), recrutamento de células imunes, aumento de permeabilidade endotelial (inclusive da BHE) e autofagia (Calandra and Roger 2003, Chuang, Su et al. 2012, Chen, Chuang et al. 2016, Howait, Albassam et al. 2019). Todos esses processos já foram descritos na infecção pelo ZIKV, porém o envolvimento de moléculas potencializados como o MIF ainda não foi descrito.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

- O objetivo deste trabalho é investigar o envolvimento do MIF na disseminação do ZIKV ao SNC, no processo inflamatório e no dano tecidual induzido pela infecção.

3.2-Objetivos específicos

- Verificar se há aumento na expressão de MIF no cérebro de camundongos neonatos selvagens infectados pelo ZIKV;
- Comparar a sobrevivência e o surgimento de sinais clínicos decorrentes da infecção pelo vírus ZIKV em camundongos selvagem (WT) e deficientes de MIF (MIF^{-/-});
- Avaliar a distribuição do ZIKV nos tecidos dos animais WT e MIF^{-/-} e a disseminação para o sistema nervoso central durante o curso da infecção;
- Avaliar se citocinas moduladas pelo MIF também estão elevadas no cérebro dos animais infectados;

4- METODOLOGIA

4.1- Modelo animal

Nos experimentos foram utilizados camundongos C57BL/6, machos e fêmeas, de genótipo selvagem (WT) ou Knockout para MIF (MIF^{-/-}). Todos os animais foram mantidos sob condições controle de temperatura (24° C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração em biotério de experimentação.

Os animais neonatos com 3 ou 6 dias de idade (P3 ou P6) foram infectados com 50 µL contendo 10⁴ ou 10⁶ PFU de ZIKV diluído em meio L15 (invitrogen). Os grupos controle (Mock) receberam 50 µL de sobrenadante de cultura de células não infectadas, também em P3 ou P6, diluído em meio L15 (invitrogen) na mesma proporção da diluição do vírus. As inoculações foram feitas via subcutânea no dorso.

Os animais foram monitorados diariamente para observação de sinais clínicos da doença como perda de peso, convulsões e paralisia dos membros posteriores. Além disso, em 6 e 12 d.p.i., conforme descrito como pico da infecção (Nem de Oliveira

Souza, Frost et al. 2018), os animais foram eutanasiados com o uso de isofluorano 5% e foi feita a coleta de diversos tecidos (cérebro, músculo, fígado e baço). As amostras foram imediatamente colocadas no gelo durante a coleta e estocadas em freezer -80° C até o momento da análise.

Todos os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho estão de acordo com as regulamentações vigentes sobre ética e experimentação animal e estão aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização Animal da Universidade Federal do Rio de Janeiro n° 036/18.

4.2- Propagação do estoque de ZIKV

Nos experimentos foi usado o vírus ZIKV^{BR}, vírus isolado de um paciente com quadro febril no estado de Pernambuco, Brasil (n.º de referência no gene bank: KX197192). Para propagação do estoque de vírus, células C636 são infectadas com o ZIKV em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 em meio de cultura L15 (meio Leibovitz's) não suplementado e mantidas em ambiente a 28°C por 1 hora. Após esse período o meio é removido e as células são mantidas em meio L15 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) a 28°C durante 7 dias e por fim o sobrenadante da cultura é coletado, clarificado por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos, aliquotado e estocado a -80°C.

O título viral do estoque é determinado por ensaio de placa de lise em células VERO cultivadas em placa de 24 poços. O estoque é diluído por diluição seriada de 10⁻¹ a 10⁻⁶ em meio DMEM high não suplementado e as células são infectadas com 200 µL dessas diluições e incubadas a 37°C por 1 hora. Em seguida é adicionado 1 mL de DMEM high com 1,5% de carboximetilcelulose (CMC), 1% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina. Após mais 5 dias de incubação, as células são fixadas com formaldeído 10% por 30 minutos e então coradas com solução corante de cristal violeta (20% Etanol, 1% cristal violeta e água) por mais 30 minutos permitindo a visualização e contagem das unidades formadoras de plaques (PFU).

4.3- Quantificação de RNA viral

As quantificações foram feitas por PCR em tempo real (qPCR); para isso os animais infectados foram eutanasiados e os diferentes tecidos foram coletados, homogeneizados em meio de cultura (DMEM) na proporção 1:2 com homogenizador de tecido a 5.000 rpm e o RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen™), seguindo o protocolo do fabricante. O RNA total extraído foi ressuspenso em 20 µL água DEPC e quantificado em um NanoDrop de forma a usar 2 µg de RNA para reação de transcrição reversa, onde foi utilizado o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription, também seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. A carga viral foi quantificada por qPCR em tempo real utilizando TaqMan® multiplex Master Mix. Na reação de PCR foram utilizados os primers para uma porção codificante da proteína do envelope do ZIKV (direto 5'-CCG CTG CCC AAC ACA AG-3'; reverso, 5'-CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT-3') e a sonda ZIKV_1107_fam (5'-/56-FAM/AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA A/3BHQ_1/-3') (Lanciotti, Kosoy et al. 2008), seguindo o protocolo estabelecido de 45 ciclos de amplificação consistindo em 95° C durante 30 segundos e 60° C durante 1 minuto em StepOnePlus Real-Time PCR System. Os valores do doCt (*cycletreshold*) das amostras foram usados para calcular a equivalência de log₁₀ PFU/mg de tecido após conversão usando uma curva padrão feita com diluições seriadas de 10x de um estoque de ZIKV de título conhecido.

4.4- Quantificação da expressão de citocinas

A quantificação da expressão de citocinas foram feitas por qPCR em tempo real no cérebro dos animais com 12 dias pós infecção (d.p.i). Para isso, após a obtenção do cDNA das amostras conforme descrito anteriormente, as mesmas foram então submetidas a qPCR usando Power SYBR Green Master Mix.

As reações foram realizadas utilizando iniciadores específicos para os seguintes genes murinos: MIF (direto, 5'- TGC CCA GAA CCG CAA CTA CAG TAA -3'; reverso 5'-TCG CTA CCG GTG GAT AAA CAC AGA -3'), IL-6 (direto, 5'- TCA TAT CTT CAA CCA AGA GGT A-3'; reverso, 5'-CAG TGA GGA ATG TCC ACA AAC TG-3'), TNF-α (direto, 5'- CCT CAC ACT CAG ATC ATC TTC TCA-3';

reverso, 5'-TGC TTG TCT TTG AGA TCC ATG C-3') e β -actina (direto, 5'-TGT GAC GTT GAC ATC CGT AAA-3'; reverso, 5'-GTA CTT GCG CTC AGG AGG AG-3') como gene constitutivo controle. Os resultados foram analisados em expressão relativa ao gene constitutivo e aos controles estão expressos em $\Delta\Delta Ct$.

4.5- Análise estatística

Todos os gráficos e análises estatísticas deste trabalho serão realizadas em *software* GraphPadPrism® 6. As análises comparativas entre os grupos serão feitas por teste t com intervalo de confiança de 95%. A diferença será considerada significativa quando o valor de p for <0.05.

5- RESULTADOS

5.1- A infecção pelo ZIKV induz aumento na expressão de MIF no cérebro de maneira dependente da carga viral e da idade.

Para investigar o impacto do MIF na infecção pelo ZIKV utilizamos um modelo de infecção em camundongos C57BL/6 neonatos imunocompetentes (WT) com 3 dias e 6 dias de idade (P3 e P6, respectivamente) infectados por via subcutânea. Nosso primeiro passo foi avaliar a expressão do MIF no cérebro dos camundongos P3 ou P6 WT infectados com diferentes cargas de ZIKV (10^4 ou 10^6 PFU). A análise da expressão foi realizada por qPCR em relação ao grupo Mock (sobrenadante de cultura de células não infectadas) no décimo segundo dia após-infecção (d.p.i.), o qual foi descrito previamente como o momento do pico da replicação do ZIKV (Li, Armstrong et al. 2018, Nem de Oliveira Souza, Frost et al. 2018). Os resultados mostraram que os animais em P3 infectados com 10^6 PFU apresentaram um aumento significativo na expressão de MIF no cérebro quando comparados aos controles (Figura 5A). Podemos observar uma tendência a aumento na expressão do MIF nos animais que receberam a menor carga viral (Figura 5A). Além disso, avaliamos a expressão do MIF em animais P6 com a maior carga viral e foi observado que não existe um aumento significativo na

expressão no cérebro quando comparados aos controles (Figura 5B). Estes resultados indicam que a infecção pelo ZIKV induz um aumento na expressão de MIF de maneira dose e idade dependente.

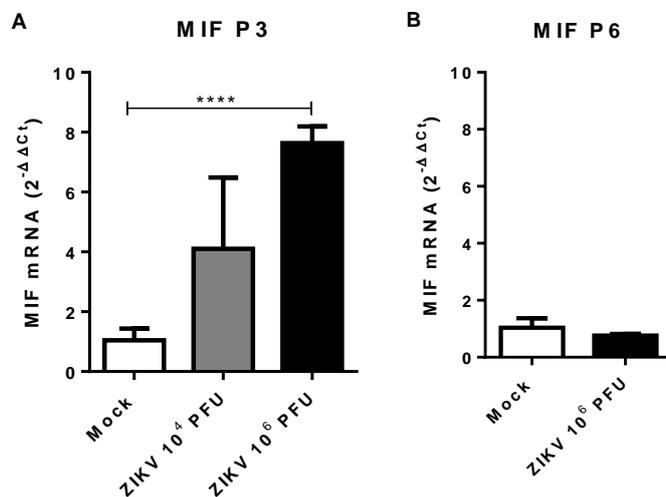


Figura5: A infecção pelo ZIKV aumenta a expressão de MIF no cérebro de camundongos WT. Camundongos C57BL/6 wildtype (WT) foram infectados via subcutânea no dorso com 10⁶ ou 10⁴ PFU de ZIKV em P3 ou com 10⁶ PFU em P6 ou com mock. Os cérebros dos animais foram coletados em 12 d.p.i. e a quantificação da expressão de MIF foi feita por RT-qPCR com SYBRgreen. Os experimentos foram realizados com 2 ou 3 animais por grupo em 1 experimento em P6 e em P3 com 10⁴ PFU de ZIKV e com 3 animais por grupo em 2 experimentos independentes em P3 com 10⁶ PFU de ZIKV. **** P<0,0001

5.2- A infecção pelo ZIKV induziu perda de peso e elevada letalidade nos camundongos WT mas não nos MIF^{-/-} em modelo de infecção subletal.

Visto que a expressão de MIF está aumentada durante a infecção pelo ZIKV, foram feitas curvas de ganho de peso e de sobrevivência utilizando tanto camundongos WT quanto deficientes de MIF (MIF^{-/-}) para avaliar se a ausência da citocina afetaria a progressão da doença em camundongos neonatos. Novamente os camundongos neonatos C57BL/6 WT ou MIF^{-/-} foram infectados por via subcutânea no dorso com 10⁶ ou 10⁴ PFU (unidades formadoras de placa) de ZIKV enquanto os grupos controles receberam sobrenadante de cultura de células não infectadas (Mock). Os animais foram

monitorados diariamente para observação dos sinais clínicos da doença, como perda de peso, tremores, ataxia, paralisia dos membros posteriores, convulsões e morte.

Nos grupos que receberam a menor dose, os animais $MIF^{-/-}$ não apresentaram taxa de letalidade (figura 6B) e também não apresentaram sinais clínicos da doença enquanto todos os camundongos WT apresentaram sinais clínicos da infecção como ataxia, paralisia dos membros posteriores e não ganharam peso ao longo dos dias pós-infecção (figura 6A) morrendo todos até 18 d.p.i. (figura 6B). Esses experimentos com 10^4 PFU foram realizados apenas 1 vez com quantidades de animais diferentes entre os grupos (4 WT e 6 $MIF^{-/-}$), logo precisam ser repetidos.

Nos animais que receberam 10^6 PFU de ZIKV, observou-se que tanto os WT quanto os $MIF^{-/-}$ paravam de ganhar peso entre 10 e 12 d.p.i. e não houve diferença significativa no ganho de peso em nenhum momento da infecção (Figura 6C). Além disso, os animais dos 2 grupos infectados apresentaram sinais clínicos de doença com letargia, tremores, ataxia, paralisia das patas traseiras, convulsões e baixa taxa de sobrevivência (Figura 6D) mas também sem diferença significativa.

Já os animais infectados em P6, os $MIF^{-/-}$ e os WT não apresentaram quaisquer sinais clínicos da doença e, embora não tenha ocorrido morte no grupo dos $MIF^{-/-}$ houve uma redução de 25% na sobrevivência dos WT, porém sem diferenças significativas na sobrevivência devido a diferença no n de animais por grupo (4 WT e 6 $MIF^{-/-}$) (Figura 6 E e F).

Estes resultados indicam que nos modelos onde o MIF é induzido (P3 com 10^4 ou 10^6 PFU), os animais apresentam sinais clínicos da infecção e mortalidade de forma dose dependente. Já os animais o em P6, os quais não tiveram indução de MIF, não apresentam sinais clínicos aparentes.

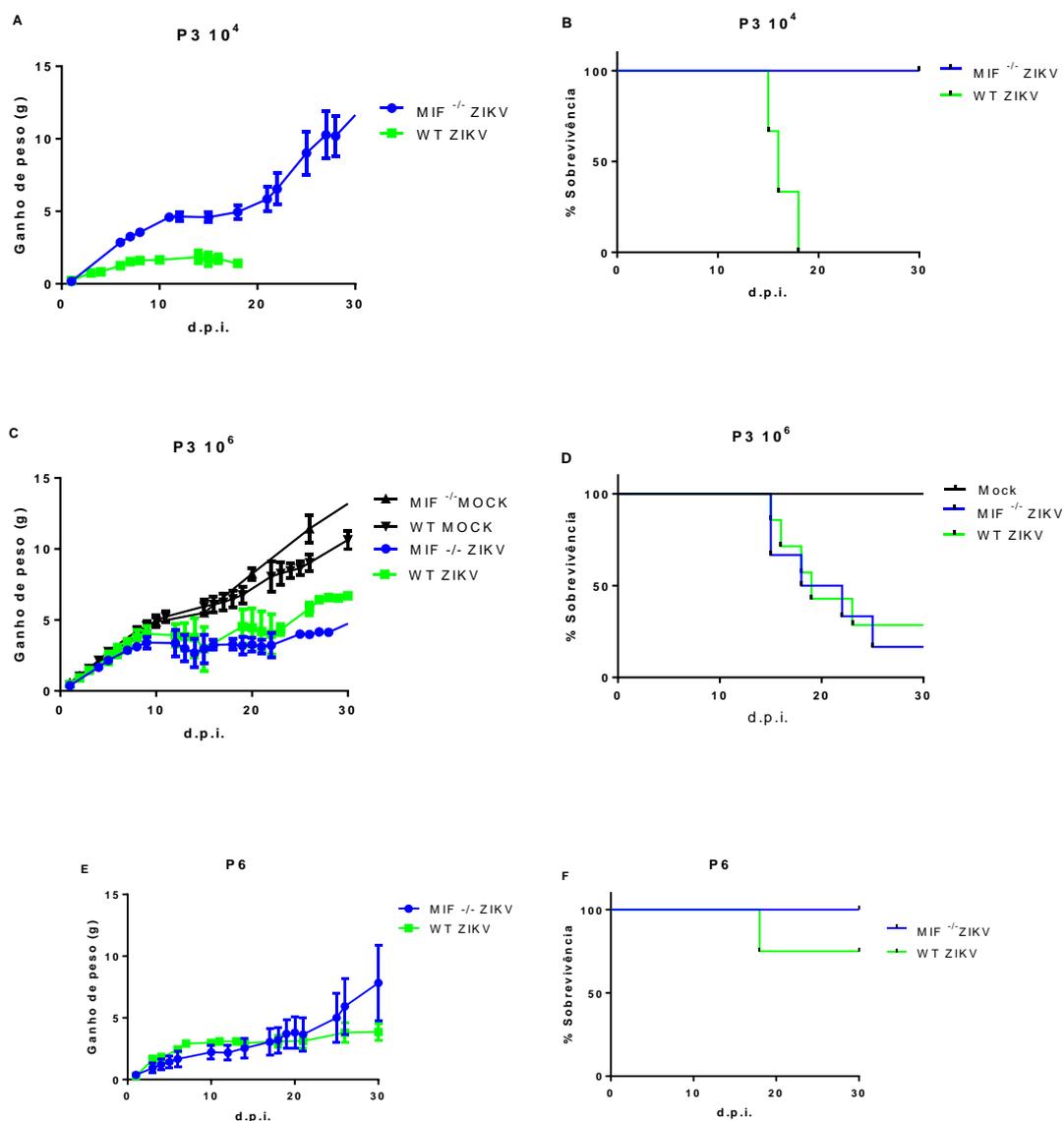


Figura 6: A infecção pelo ZIKV induziu perda de peso e elevada letalidade nos camundongos WT mas não nos MIF^{-/-} em modelo de infecção subletal. Camundongos C57BL/6 WT e MIF^{-/-} foram infectados via subcutânea no dorso em P3 com 10⁴ (A e B) ou 10⁶ (C e D) PFU de ZIKV ou em P6 (E e F) com 10⁶ PFU de ZIKV. Os animais foram pesados e monitorados. Os experimentos em P3 com 10⁶ PFU foram realizados em dois experimentos independentes com 5 ou 6 animais por grupo. Os experimentos em P3 com 10⁴ e em P6 foram realizados em um experimento com 4 ou 6 animais por grupo.

5.3- A ausência do MIF não interferiu na disseminação viral nos animais infectados, porém atua na capacidade dos mesmos de controlar a infecção no modelo com a menor carga.

O próximo passo foi avaliar se a ausência do MIF afetaria a replicação e dispersão do vírus no organismo dos camundongos e para isso foi coletado o cérebro, músculo, fígado e baço dos animais infectados com ZIKV para análise da carga viral por qRT-PCR. Foram escolhidos os dias 6 e 12 d.p.i. para coleta dos tecidos, por já serem descritos como o pico da infecção nesse modelo experimental (Li, Armstrong et al. 2018, Nem de Oliveira Souza, Frost et al. 2018).

Os resultados mostram que os animais infectados com 10^4 PFU de ZIKV de ambos genótipos apresentam vírus no cérebro já em 6 d.p.i., porém enquanto os animais MIF^{-/-} mantiveram a carga viral em 12 d.p.i. os animais WT tiveram um aumento na carga (Figura 7A). Já na infecção em P3 com 10^6 PFU, tanto os WT quanto os MIF^{-/-} apresentam elevada carga viral no cérebro muito maior que nos animais que receberam a 10^4 PFU de ZIKV já 6 d.p.i. e aumentando em 12 d.p.i., porém não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 7B). Na infecção em P6 foi possível detectar RNA viral no cérebro dos animais de ambos genótipos, porém em menor quantidade, e a carga viral se manteve de 6 para 12 d.p.i. (Figura 7C).

Estes resultados indicam que a ausência de MIF não influencia na dispersão do vírus ao SNC mas que em modelo de infecção mais brando, possivelmente atua na capacidade dos animais de controlar a replicação.

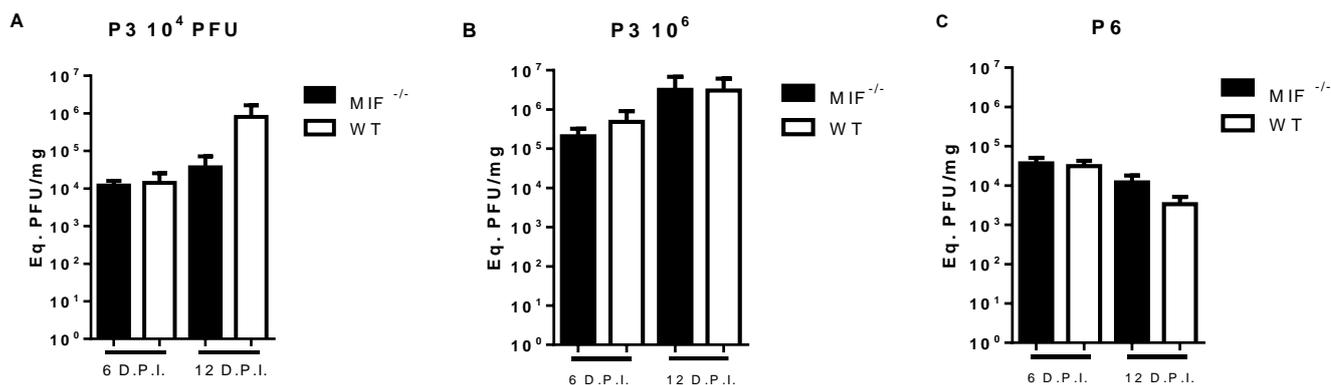


Figura 7: A ausência do MIF não resulta em uma menor disseminação para o SNC. Camundongos WT ou MIF^{-/-} foram inoculados por via subcutânea na região dorsal com 10⁴ ou 10⁶ PFU de ZIKV em P3 (A e B) ou com 10⁶ PFU em P6 (C). O cérebro dos animais foi coletado, em diferentes dias após a infecção. O RNA viral foi avaliado por RT-PCR. Os experimentos foram realizados com 3 animais por grupo em 2 experimentos independentes nos animais P3 infectados com 10⁶ PFU e os experimentos com os P3 infectados 10⁴ PFU e os P6 foram realizados com 2 ou 3 animais por grupo em um experimento.

Já no músculo, fígado e baço as análises foram feitas somente nos animais infectados em P3 com 10⁶ PFU até o momento. Os resultados mostram que a carga viral foi bem menor, quando comparado ao cérebro, e se manteve constante entre 6 e 12 d.p.i., também não apresentando diferença significativa entre os 2 grupos (Figura 8A-C). Estes resultados indicam que a ausência de MIF não afeta a replicação do ZIKV em tecidos periféricos.

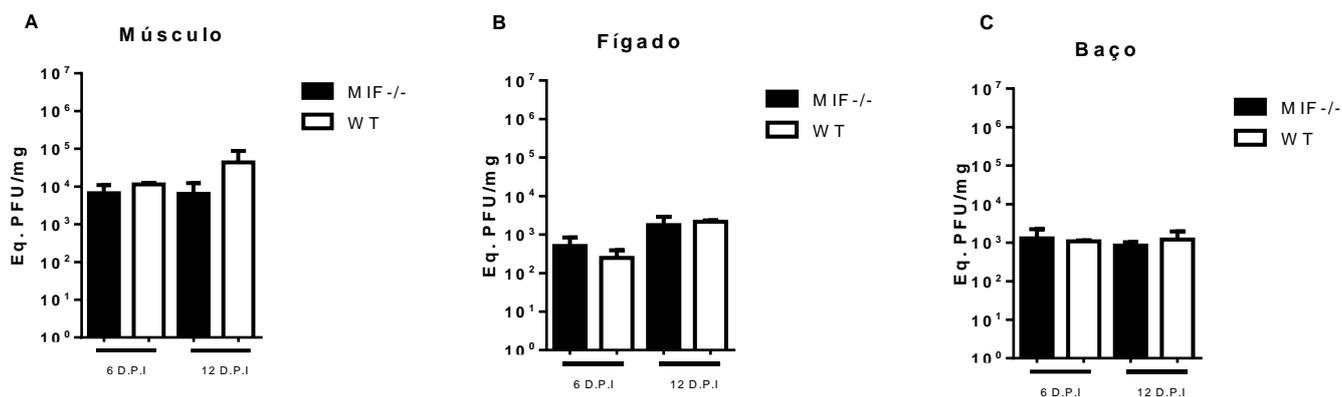


Figura 8: A ausência de MIF não afetou a disseminação e replicação do ZIKV em tecidos periféricos. Camundongos WT ou MIF^{-/-}, foram inoculados por via subcutânea na região dorsal com 10⁶PFU de ZIKV em P3. Músculo (A), fígado (B) e baço (C) dos animais foram coletados, em diferentes dias após a infecção. O RNA viral foi avaliado por RT-PCR. Os experimentos foram realizados com 3 animais por grupo em 2 experimentos independentes.

5.4- A infecção pelo ZIKV aumenta a expressão de TNF- α e IL-6 no cérebro de camundongos

Por fim, para avaliar se o ZIKV induz inflamação no cérebro dos animais foi feita quantificação da expressão de duas citocinas sabidamente induzidas por MIF, TNF- α e IL-6 (Carli, Metz et al. 2009, Howait, Albassam et al. 2019). Os cérebros dos camundongos WT e MIF^{-/-}, infectados com 10⁶ PFU ou MOCK, foram coletados em 12 d.p.i. (por ser o pico da infecção) e a expressão das citocinas foi analisada por qPCR. Nos resultados vemos que ambas citocinas estão muito aumentadas nos animais infectados, porém não há diferença significativa na expressão de TNF- α e IL-6 entre os WT e os MIF^{-/-} infectados (Figura 9).

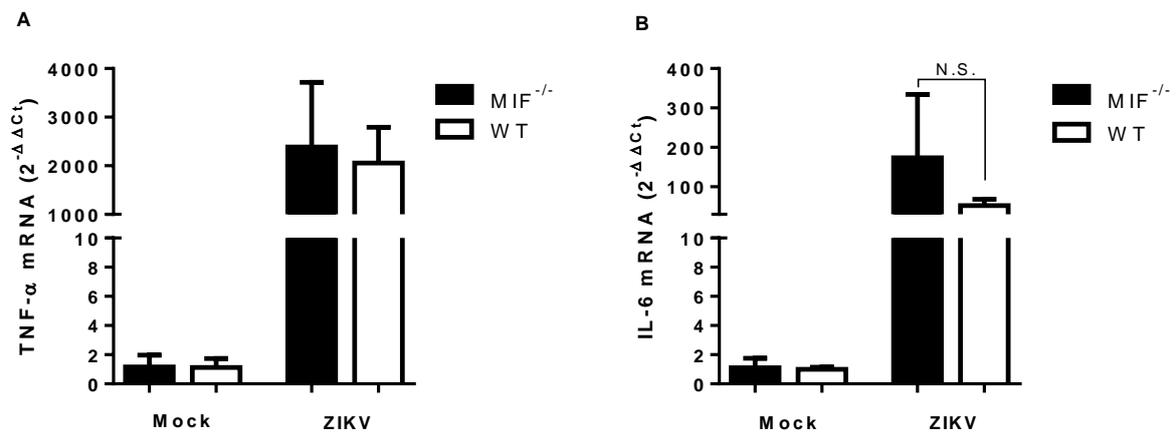


Figura 9: A infecção pelo ZIKV aumenta a expressão de TNF- α e IL-6 no cérebro de camundongos de ambos genótipos. O cérebro foi coletado de animais do grupo controle e dos infectados em 12 d.p.i., o RNA extraído desses tecidos e foi analisada a expressão de citocinas. Os níveis de produção de TNF- α (A) e IL-6 (B) foram quantificados por PCR em tempo real. Os experimentos foram realizados com 3 animais por grupo em 2 experimentos independentes * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle.

6- DISCUSSÃO

O ZIKV é um vírus neurotrópico que pode ser transmitido da mãe para o feto durante a gestação e infectar o sistema nervoso do feto podendo levar a um amplo espectro de anomalias e desordens neurológicas graves, dentre elas a microcefalia (Calvet, Aguiar et al. 2016, Martines, Bhatnagar et al. 2016). Os mecanismos de ação pelos quais o ZIKV infecta o SNC e induz dano no tecido ainda não são completamente elucidados. Diversos estudos mostram que o vírus é capaz de infectar células progenitoras neurais e neurônios levando a morte celular (Souza, Sampaio et al. 2016, Tang, Hammack et al. 2016). O ZIKV também é capaz de induzir resposta inflamatória robusta levando a formação de infiltrado de células inflamatórias no cérebro bem como é capaz de induzir o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Aliota, Caine et al. 2016, Nem de Oliveira Souza, Frost et al. 2018).

Infecções por outros flavivírus encefalíticos, como o WNV, JEV e TBEV, também são descritas por causarem extenso dano tecidual e produção exacerbada de citocinas durante a infecção (Gelpi, Preusser et al. 2005, Arjona, Foellmer et al. 2007, Li, Wang et al. 2015). O MIF é uma destas citocinas e está envolvido na neuropatogênese destes flavivírus, podendo ser encontrado no soro e LCR de pacientes com encefalopatias decorrentes destas infecções (Suzuki, Ogata et al. 2000, Arjona, Foellmer et al. 2007, Grygorczuk, Parczewski et al. 2017).

Neste trabalho investigamos se a infecção pelo ZIKV induz o aumento na produção do MIF, como na infecção por outros flavivírus, bem como sua possível participação na patogênese do ZIKV. Nossos resultados mostram que a infecção em P3 com a maior carga viral leva a um aumento exacerbado na expressão do MIF no cérebro e na infecção com menor carga leva a uma tendência ao aumento enquanto na infecção em P6 a citocina não é modulada. Estes dados coincidiram com o surgimento de sinais clínicos nos animais, os quais só apresentaram sintomas na infecção em P3. Isto condiz com estudos de modelos de infecção em murinos que mostram que a susceptibilidade dos camundongos a infecção pelo ZIKV varia de acordo com a idade e a carga viral injetada, diminuindo conforme os animais ficam mais velhos (Grant, Ponia et al. 2016, Lazear, Govero et al. 2016, Rossi, Tesh et al. 2016, Li, Armstrong et al. 2018).

Em nossos ensaios observamos que somente na infecção em P3 são observados sinais clínicos e uma elevada carga viral no cérebro dos animais. A maior

susceptibilidade dos animais a infecção em P3 em relação aos P6 pode estar atrelada ao estágio de desenvolvimento do cérebro e do sistema imune dos camundongos nessas idades. O desenvolvimento do SNC em camundongos continua após o nascimento e nestas idades corresponde aproximadamente ao final do 2º trimestre e final do 3º trimestre da gestação em humanos respectivamente (Clancy, Darlington et al. 2001, Semple, Blomgren et al. 2013). Junto a isso, já se sabe que o ZIKV infecta preferencialmente células precursoras neurais e neurônios imaturos *in vitro* e que em humanos o risco do desenvolvimento de complicações neurológicas pelo ZIKV diminui conforme o avanço da gravidez devido, entre outros fatores, ao desenvolvimento do SNC e a maturidade do sistema imune em humanos (Brasil, Pereira et al. 2016, Cauchemez, Besnard et al. 2016, Souza, Sampaio et al. 2016, Tang, Hammack et al. 2016, Gabriel, Ramani et al. 2017). Isto pode explicar a baixa carga viral e expressão de MIF observada no cérebro dos camundongos infectados em P6, visto que estes apresentam menos células precursoras neurais e neurônios imaturos somado a um sistema imune mais maduro devido ao estágio de desenvolvimento em que se encontram tornando-os capazes de controlar melhor a infecção.

Para avaliar se a ausência de MIF afetaria a progressão da doença, infectamos camundongos WT e MIF^{-/-} em P3 ou P6. Os animais com 6 dias de idade, conforme dito anteriormente, correspondem ao feto no estágio final da gestação humana. Consistente com isso a infecção não induziu sinais clínicos significativos em ambos os grupos testados. Como era esperado, a infecção também não induziu aumento significativo na expressão de MIF já que os animais aparentemente conseguiram controlar a infecção sem apresentar sinais clínicos, os quais são decorrentes em parte da resposta imune exacerbada (Manangeeswaran, Ireland et al. 2016, Li, Armstrong et al. 2018, Nem de Oliveira Souza, Frost et al. 2018).

Na infecção em P3 usando a maior carga viral, os animais desenvolveram doença grave com diversos sinais clínicos, elevada carga viral no cérebro e produção exacerbada de citocinas e elevada mortalidade. Isso condiz com o que foi descrito anteriormente de que a susceptibilidade dos animais, e consequente progressão da doença, varia de acordo com a idade dos animais. Porém, ainda que tenha sido observado um aumento significativo na expressão de MIF, não houveram diferenças significativas nos sinais clínicos, carga viral e expressão de citocinas entre os WT e os MIF^{-/-}. Talvez isso se deva ao fato deste modelo de infecção ser muito letal, levando a

uma exacerbação da resposta imune e progressão rápida da doença à morte que pode estar mascarando um possível efeito protetor da ausência do MIF. Outro fator que pode estar envolvido na potencialização do dano induzido pela infecção mesmo na ausência do MIF é o aumento exacerbado na expressão de TNF- α e IL-6 observado nos animais. Diversos estudos mostram que o aumento exacerbado na produção de citocinas pró-inflamatórias tem papel central no desenvolvimento neuropatias (Tohidpour, Morgun et al. 2017). Além disso, já foi mostrado que a neutralização de TNF- α em camundongos neonatos infectados com ZIKV pode prevenir convulsões nos animais jovens e adultos expostos ao vírus (Nem de Oliveira Souza, Frost et al. 2018).

Condizente com isso, ao testarmos uma menor carga viral foi possível observar diferenças significativas na progressão da infecção nos camundongos WT e nos MIF^{-/-}, onde os camundongos MIF^{-/-} não apresentaram os sinais clínicos da infecção enquanto os WT apresentaram um quadro semelhante ao da infecção com 10⁶ PFU, com tremores, ataxia, paralisia nos membros posteriores, perda de peso persistente e morte. Estes resultados se assemelham ao que já havia sido descrito em modelo de infecção com WNV, onde os animais deficientes de MIF apresentavam sinais clínicos mais brandos da infecção e mortalidade reduzida. Também observamos que, estes animais apresentam RNA viral no cérebro, ainda que em menor quantidade em relação a infecção com a maior carga, e que os MIF^{-/-} parecem controlar a infecção mantendo a carga viral de 6 para 12 d.p.i., ao contrário dos WT onde há um aumento. Estes resultados sugerem que a ausência do MIF preveniu o desenvolvimento dos sinais clínicos da infecção mas sem afetar a replicação viral. Outros estudos mostram o MIF pode ter papel na exacerbação do dano tecidual induzido em infecções sem afetar a carga do patógeno. No caso da infecção por CHIKV e RRV (outros arbovírus), já foi mostrado que o CD74 (principal receptor do MIF) medeia a artrite e miosite induzidas por estes vírus sem afetar a replicação viral de forma MIF-dependente (Herrero, Sheng et al. 2013). Estes experimentos possuem n=1 e os grupos possuíam quantidades diferentes de animais (4 WT e 6 MIF^{-/-}) e a diferença no tamanho da ninhada pode ter influenciado os resultados logo estes experimentos precisam ser repetidos para confirmar os dados.

Nossos achados sugerem um papel do MIF na patogênese do ZIKV onde, assim como foi mostrado para o WNV, sua ausência interferiu na progressão da doença levando a sinais clínicos mais brandos e que foram resolvidos mais rapidamente. Porém, estes achados precisam ser confirmados e pretendemos realizar outros experimentos

como quantificação na expressão de outras citocinas na infecção com 10^4 PFU além de análises histopatológicas do cérebro dos animais.

A avaliação do papel do MIF na infecção pelo ZIKV é importante pois o MIF poderia ser um alvo terapêutico no tratamento das formas graves da infecção. A inibição farmacológica de MIF já se mostrou eficaz em diversos modelos experimentais no controle de doenças inflamatórias autoimunes, sepse, além da infecção pelo WNV (Lubetsky, Dios et al. 2002, Arjona, Foellmer et al. 2007, Sainaghi, Collimedaglia et al. 2010, Kang and Bucala 2019, Song, Zhu et al. 2019).

7- CONCLUSÕES

- Animais infectados em P6, independente da ausência ou não do MIF, já são capazes de controlar mais rapidamente a infecção, não apresentando sinais clínicos evidentes tão pouco há aumento na expressão de MIF.
- A infecção em animais mais jovens (P3) com elevada carga viral (10^6 PFU) leva ao surgimento de sinais clínicos graves e alta mortalidade, porém sem diferenças significativas entre os grupos e talvez isto se deva ao modelo de infecção com progressão rápida da doença a morte possivelmente estar mascarando um possível efeito protetor da ausência do MIF.
- A infecção em P3 com 10^4 PFU indicam que de fato existe um papel protetor da ausência do MIF visto que os animais deficientes não apresentaram sinais clínicos ao contrário dos WT, e isto provavelmente está relacionado a capacidade do MIF de potencializar o dano induzido pela infecção.

8- REFERÊNCIAS

- Adams Waldorf, K. M., B. R. Nelson, J. E. Stencel-Baerenwald, C. Studholme, R. P. Kapur, B. Armistead, C. L. Walker, S. Merillat, J. Vornhagen, J. Tisoncik-Go, A. Baldessari, M. Coleman, M. K. Dighe, D. W. W. Shaw, J. A. Roby, V. Santana-Ufret, E. Boldenow, J. Li, X. Gao, M. A. Davis, J. A. Swanstrom, K. Jensen, D. G. Widman, R. S. Baric, J. T. Medwid, K. A. Hanley, J. Ogle, G. M. Gough, W. Lee, C. English, W. M. Durning, J. Thiel, C. Gatenby, E. C. Dewey, M. R. Fairgrieve, R. D. Hodge, R. F. Grant, L. Kuller, W. B. Dobyns, R. F. Hevner, M. Gale, Jr. and L. Rajagopal (2018). "Congenital Zika virus infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain." Nat Med **24**(3): 368-374.
- Akoua-Koffi, C., S. Diarrassouba, V. B. Benie, J. M. Ngbichi, T. Bozoua, A. Bosson, V. Akran, P. Carnevale and A. Ehouman (2001). "[Investigation surrounding a fatal case of yellow fever in Cote d'Ivoire in 1999]." Bull Soc Pathol Exot **94**(3): 227-230.
- Aliota, M. T., E. A. Caine, E. C. Walker, K. E. Larkin, E. Camacho and J. E. Osorio (2016). "Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice." PLoS Negl Trop Dis **10**(4): e0004682.
- Alves-Leon, S. V., M. D. R. Lima, P. C. G. Nunes, L. M. C. Chimelli, K. Rabelo, R. M. R. Nogueira, F. de Bruycker-Nogueira, E. L. de Azeredo, P. R. Bahia, F. C. Rueda Lopes, J. P. B. Marcondes de Souza, F. L. Fontes-Dantas, M. V. Paes, E. R. Lemos and F. B. Santos (2018). "Zika virus found in brain tissue of a multiple sclerosis patient undergoing an acute disseminated encephalomyelitis-like episode." Mult Scler: 1352458518781992.
- Arjona, A., H. G. Foellmer, T. Town, L. Leng, C. McDonald, T. Wang, S. J. Wong, R. R. Montgomery, E. Fikrig and R. Bucala (2007). "Abrogation of macrophage migration inhibitory factor decreases West Nile virus lethality by limiting viral neuroinvasion." J Clin Invest **117**(10): 3059-3066.
- Assuncao-Miranda, I., F. A. Amaral, F. A. Bozza, C. T. Fagundes, L. P. Sousa, D. G. Souza, P. Pacheco, G. Barbosa-Lima, R. N. Gomes, P. T. Bozza, A. T. Da Poian, M. M. Teixeira and M. T. Bozza (2010). "Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection." FASEB J **24**(1): 218-228.
- Azevedo, R. S., M. T. Araujo, A. J. Martins Filho, C. S. Oliveira, B. T. Nunes, A. C. Cruz, A. G. Nascimento, R. C. Medeiros, C. A. Caldas, F. C. Araujo, J. A. Quaresma, B. C. Vasconcelos, M. G. Queiroz, E. S. da Rosa, D. F. Henriques, E. V. Silva, J. O. Chiang, L. C. Martins, D. B. Medeiros, J. A. Lima, M. R. Nunes, J. F. Cardoso, S. P. Silva, P. Y. Shi, R. B. Tesh, S. G. Rodrigues and P. F. Vasconcelos (2016). "Zika virus epidemic in Brazil. I. Fatal disease in adults: Clinical and laboratorial aspects." J Clin Virol **85**: 56-64.
- Azevedo, R. S. S., M. T. Araujo, C. S. Oliveira, A. J. M. Filho, B. T. D. Nunes, D. F. Henriques, E. V. P. Silva, V. L. Carvalho, J. O. Chiang, L. C. Martins, B. C. B. Vasconcelos, J. R. Sousa, F. M. C. Araujo, E. M. Ribeiro, A. R. P. Castro, M. G. L. de Queiroz, M. P. Verotti, M. R. T. Nunes, A. C. R. Cruz, S. G. Rodrigues, P. Y. Shi, J. A. S. Quaresma, R. B. Tesh and P. F. C. Vasconcelos (2018). "Zika Virus Epidemic in Brazil. II. Post-Mortem Analyses of Neonates with Microcephaly, Stillbirths, and Miscarriage." J Clin Med **7**(12).
- Azevedo, R. S. S., J. R. de Sousa, M. T. F. Araujo, A. J. Martins Filho, B. N. de Alcantara, F. M. C. Araujo, M. G. L. Queiroz, A. C. R. Cruz, B. H. B. Vasconcelos, J. O. Chiang, L. C. Martins, L. M. N. Casseb, E. V. da Silva, V. L. Carvalho, B. C. B. Vasconcelos, S. G. Rodrigues, C. S. Oliveira, J. A. S. Quaresma and P. F. C. Vasconcelos (2018). "In situ immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus." Sci Rep **8**(1): 1.
- Barjas-Castro, M. L., R. N. Angerami, M. S. Cunha, A. Suzuki, J. S. Nogueira, I. M. Rocco, A. Y. Maeda, F. G. Vasami, G. Katz, I. F. Boin, R. S. Stucchi, M. R. Resende, D. L. Esposito, R. P. de Souza, B. A. da Fonseca and M. Addas-Carvalho (2016). "Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil." Transfusion **56**(7): 1684-1688.

- Baud, D., D. J. Gubler, B. Schaub, M. C. Lanteri and D. Musso (2017). "An update on Zika virus infection." *Lancet* **390**(10107): 2099-2109.
- Benedek, G., R. Meza-Romero, K. Jordan, Y. Zhang, H. Nguyen, G. Kent, J. Li, E. Siu, J. Frazer, M. Piecychna, X. Du, A. Sreih, L. Leng, J. Wiedrick, S. J. Caillier, H. Offner, J. R. Oksenberg, V. Yadav, D. Bourdette, R. Bucala and A. A. Vandenberg (2017). "MIF and D-DT are potential disease severity modifiers in male MS subjects." *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**(40): E8421-E8429.
- Bernhagen, J., R. Krohn, H. Lue, J. L. Gregory, A. Zerneck, R. R. Koenen, M. Dewor, I. Georgiev, A. Schober, L. Leng, T. Kooistra, G. Fingerle-Rowson, P. Ghezzi, R. Kleemann, S. R. McColl, R. Bucala, M. J. Hickey and C. Weber (2007). "MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment." *Nat Med* **13**(5): 587-596.
- Besnard, M., D. Eyrolle-Guignot, P. Guillemette-Artur, S. Lastere, F. Bost-Bezeaud, L. Marcelis, V. Abadie, C. Garel, M. L. Moutard, J. M. Jouannic, F. Rozenberg, I. Leparc-Goffart and H. P. Mallet (2016). "Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia." *Euro Surveill* **21**(13).
- Besnard, M., S. Lastere, A. Teissier, V. Cao-Lormeau and D. Musso (2014). "Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014." *Euro Surveill* **19**(13).
- Bido-Medina, R., J. Wirsich, M. Rodriguez, J. Oviedo, I. Miches, P. Bido, L. Tusen, P. Stoeter and S. Sadaghiani (2018). "Impact of Zika Virus on adult human brain structure and functional organization." *Ann Clin Transl Neurol* **5**(6): 752-762.
- Bozza, M. T., Y. C. Martins, L. A. Carneiro and C. N. Paiva (2012). "Macrophage migration inhibitory factor in protozoan infections." *J Parasitol Res* **2012**: 413052.
- Brasil, P., J. P. Pereira, Jr., M. E. Moreira, R. M. Ribeiro Nogueira, L. Damasceno, M. Wakimoto, R. S. Rabello, S. G. Valderramos, U. A. Halai, T. S. Salles, A. A. Zin, D. Horovitz, P. Daltro, M. Boechat, C. Raja Gabaglia, P. Carvalho de Sequeira, J. H. Pilotto, R. Medialdea-Carrera, D. Cotrim da Cunha, L. M. Abreu de Carvalho, M. Pone, A. Machado Siqueira, G. A. Calvet, A. E. Rodrigues Baiao, E. S. Neves, P. R. Nassar de Carvalho, R. H. Hasue, P. B. Marschik, C. Einspieler, C. Janzen, J. D. Cherry, A. M. Bispo de Filippis and K. Nielsen-Saines (2016). "Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro." *N Engl J Med* **375**(24): 2321-2334.
- Brito Ferreira, M. L., C. A. Antunes de Brito, A. J. P. Moreira, M. I. de Moraes Machado, A. Henriques-Souza, M. T. Cordeiro, E. T. de Azevedo Marques and L. J. Pena (2017). "Guillain-Barre Syndrome, Acute Disseminated Encephalomyelitis and Encephalitis Associated with Zika Virus Infection in Brazil: Detection of Viral RNA and Isolation of Virus during Late Infection." *Am J Trop Med Hyg* **97**(5): 1405-1409.
- Calandra, T. and T. Roger (2003). "Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity." *Nat Rev Immunol* **3**(10): 791-800.
- Calvet, G., R. S. Aguiar, A. S. O. Melo, S. A. Sampaio, I. de Filippis, A. Fabri, E. S. M. Araujo, P. C. de Sequeira, M. C. L. de Mendonca, L. de Oliveira, D. A. Tschoeke, C. G. Schrago, F. L. Thompson, P. Brasil, F. B. Dos Santos, R. M. R. Nogueira, A. Tanuri and A. M. B. de Filippis (2016). "Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study." *Lancet Infect Dis* **16**(6): 653-660.
- Cao-Lormeau, V. M., A. Blake, S. Mons, S. Lastere, C. Roche, J. Vanhomwegen, T. Dub, L. Baudouin, A. Teissier, P. Larre, A. L. Vial, C. Decam, V. Choumet, S. K. Halstead, H. J. Willison, L. Musset, J. C. Manuguerra, P. Despres, E. Fournier, H. P. Mallet, D. Musso, A. Fontanet, J. Neil and F. Ghawche (2016). "Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study." *Lancet* **387**(10027): 1531-1539.
- Carli, C., C. N. Metz, Y. Al-Abed, P. H. Naccache and A. Akoum (2009). "Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic cells by

macrophage migration inhibitory factor: involvement of novel kinase signaling pathways." *Endocrinology* **150**(7): 3128-3137.

Carteaux, G., M. Maquart, A. Bedet, D. Contou, P. Brugieres, S. Fourati, L. Cleret de Langavant, T. de Broucker, C. Brun-Buisson, I. Leparc-Goffart and A. Mekontso Dessap (2016). "Zika Virus Associated with Meningoencephalitis." *N Engl J Med* **374**(16): 1595-1596.

Cauchemez, S., M. Besnard, P. Bompard, T. Dub, P. Guillemette-Artur, D. Eyrolle-Guignot, H. Salje, M. D. Van Kerkhove, V. Abadie, C. Garel, A. Fontanet and H. P. Mallet (2016). "Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study." *Lancet* **387**(10033): 2125-2132.

Chambers, T. J., C. S. Hahn, R. Galler and C. M. Rice (1990). "Flavivirus genome organization, expression, and replication." *Annu Rev Microbiol* **44**: 649-688.

Charlier, C., M. C. Beaudoin, T. Couderc, O. Lortholary and M. Lecuit (2017). "Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects." *Lancet Child Adolesc Health* **1**(2): 134-146.

Chen, H. R., C. H. Chao, C. C. Liu, T. S. Ho, H. P. Tsai, G. C. Perng, Y. S. Lin, J. R. Wang and T. M. Yeh (2018). "Macrophage migration inhibitory factor is critical for dengue NS1-induced endothelial glycocalyx degradation and hyperpermeability." *PLoS Pathog* **14**(4): e1007033.

Chen, H. R., Y. C. Chuang, Y. S. Lin, H. S. Liu, C. C. Liu, G. C. Perng and T. M. Yeh (2016). "Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Induces Vascular Leakage through Macrophage Migration Inhibitory Factor and Autophagy." *PLoS Negl Trop Dis* **10**(7): e0004828.

Chen, L. C., H. Y. Lei, C. C. Liu, S. C. Shiesh, S. H. Chen, H. S. Liu, Y. S. Lin, S. T. Wang, H. W. Shyu and T. M. Yeh (2006). "Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients." *Am J Trop Med Hyg* **74**(1): 142-147.

Chiang, S. and E. E. Ubogu (2013). "The role of chemokines in Guillain-Barre syndrome." *Muscle Nerve* **48**(3): 320-330.

Chuang, Y. C., W. H. Su, H. Y. Lei, Y. S. Lin, H. S. Liu, C. P. Chang and T. M. Yeh (2012). "Macrophage migration inhibitory factor induces autophagy via reactive oxygen species generation." *PLoS One* **7**(5): e37613.

Clancy, B., R. B. Darlington and B. L. Finlay (2001). "Translating developmental time across mammalian species." *Neuroscience* **105**(1): 7-17.

Cugola, F. R., I. R. Fernandes, F. B. Russo, B. C. Freitas, J. L. Dias, K. P. Guimaraes, C. Benazzato, N. Almeida, G. C. Pignatari, S. Romero, C. M. Polonio, I. Cunha, C. L. Freitas, W. N. Brandao, C. Rossato, D. G. Andrade, P. Faria Dde, A. T. Garcez, C. A. Buchpigel, C. T. Braconi, E. Mendes, A. A. Sall, P. M. Zanotto, J. P. Peron, A. R. Muotri and P. C. Beltrao-Braga (2016). "The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models." *Nature* **534**(7606): 267-271.

Culjat, M., S. E. Darling, V. R. Nerurkar, N. Ching, M. Kumar, S. K. Min, R. Wong, L. Grant and M. E. Melish (2016). "Clinical and Imaging Findings in an Infant With Zika Embryopathy." *Clin Infect Dis* **63**(6): 805-811.

da Silva, I. R. F., J. A. Frontera, A. M. Bispo de Filippis, O. Nascimento and R.-G.-Z. R. Group (2017). "Neurologic Complications Associated With the Zika Virus in Brazilian Adults." *JAMA Neurol* **74**(10): 1190-1198.

De Carvalho, N. S., B. F. De Carvalho, C. A. Fugaca, B. Doris and E. S. Biscaia (2016). "Zika virus infection during pregnancy and microcephaly occurrence: a review of literature and Brazilian data." *Braz J Infect Dis* **20**(3): 282-289.

de Fatima Vasco Aragao, M., V. van der Linden, A. M. Brainer-Lima, R. R. Coeli, M. A. Rocha, P. Sobral da Silva, M. Durce Costa Gomes de Carvalho, A. van der Linden, A. Cesario de Holanda and M.

M. Valenca (2016). "Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study." *BMJ* **353**: i1901.

de Sousa, J. R., R. S. S. Azevedo, A. J. Martins Filho, M. T. F. Araujo, E. R. C. Moutinho, B. C. Baldez Vasconcelos, A. C. R. Cruz, C. S. Oliveira, L. C. Martins, B. H. Baldez Vasconcelos, L. M. N. Casseb, J. O. Chiang, J. A. S. Quaresma and P. F. C. Vasconcelos (2018). "Correlation between Apoptosis and in Situ Immune Response in Fatal Cases of Microcephaly Caused by Zika Virus." *Am J Pathol* **188**(11): 2644-2652.

Diallo, D., A. A. Sall, C. T. Diagne, O. Faye, O. Faye, Y. Ba, K. A. Hanley, M. Buenemann, S. C. Weaver and M. Diallo (2014). "Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011." *PLoS One* **9**(10): e109442.

Dick, G. W., S. F. Kitchen and A. J. Haddow (1952). "Zika virus. I. Isolations and serological specificity." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **46**(5): 509-520.

Dowall, S. D., V. A. Graham, E. Rayner, B. Atkinson, G. Hall, R. J. Watson, A. Bosworth, L. C. Bonney, S. Kitchen and R. Hewson (2016). "A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection." *PLoS Negl Trop Dis* **10**(5): e0004658.

Driggers, R. W., C. Y. Ho, E. M. Korhonen, S. Kuivanen, A. J. Jaaskelainen, T. Smura, A. Rosenberg, D. A. Hill, R. L. DeBiasi, G. Vezina, J. Timofeev, F. J. Rodriguez, L. Levanov, J. Razak, P. Iyengar, A. Hennenfent, R. Kennedy, R. Lanciotti, A. du Plessis and O. Vapalahti (2016). "Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities." *N Engl J Med* **374**(22): 2142-2151.

Duffy, M. R., T. H. Chen, W. T. Hancock, A. M. Powers, J. L. Kool, R. S. Lanciotti, M. Pretrick, M. Marfel, S. Holzbauer, C. Dubray, L. Guillaumot, A. Griggs, M. Bel, A. J. Lambert, J. Laven, O. Kosoy, A. Panella, B. J. Biggerstaff, M. Fischer and E. B. Hayes (2009). "Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia." *N Engl J Med* **360**(24): 2536-2543.

Epelboin, Y., S. Talaga, L. Epelboin and I. Dusfour (2017). "Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes." *PLoS Negl Trop Dis* **11**(11): e0005933.

Franca, G. V., L. Schuler-Faccini, W. K. Oliveira, C. M. Henriques, E. H. Carmo, V. D. Pedi, M. L. Nunes, M. C. Castro, S. Serruya, M. F. Silveira, F. C. Barros and C. G. Victora (2016). "Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation." *Lancet* **388**(10047): 891-897.

Gabriel, E., A. Ramani, U. Karow, M. Gottardo, K. Natarajan, L. M. Gooi, G. Goranci-Buzhala, O. Krut, F. Peters, M. Nikolic, S. Kuivanen, E. Korhonen, T. Smura, O. Vapalahti, A. Papantonis, J. Schmidt-Chanasit, M. Riparbelli, G. Callaini, M. Kronke, O. Utermohlen and J. Gopalakrishnan (2017). "Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids." *Cell Stem Cell* **20**(3): 397-406 e395.

Galliez, R. M., M. Spitz, P. P. Rafful, M. Cagy, C. Escosteguy, C. S. Germano, E. Sasse, A. L. Goncalves, P. P. Silveira, P. Pezzuto, A. M. Ornelas, A. Tanuri, R. S. Aguiar and F. T. Moll (2016). "Zika Virus Causing Encephalomyelitis Associated With Immunoactivation." *Open Forum Infect Dis* **3**(4): ofw203.

Garcez, P. P., E. C. Loiola, R. Madeiro da Costa, L. M. Higa, P. Trindade, R. Delvecchio, J. M. Nascimento, R. Brindeiro, A. Tanuri and S. K. Rehen (2016). "Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids." *Science* **352**(6287): 816-818.

Gelpi, E., M. Preusser, F. Garzuly, H. Holzmann, F. X. Heinz and H. Budka (2005). "Visualization of Central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases." *J Neuropathol Exp Neurol* **64**(6): 506-512.

George, M. and J. H. Vaughan (1962). "In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity." *Proc Soc Exp Biol Med* **111**: 514-521.

- Gourinat, A. C., O. O'Connor, E. Calvez, C. Goarant and M. Dupont-Rouzeyrol (2015). "Detection of Zika virus in urine." Emerg Infect Dis **21**(1): 84-86.
- Grant, A., S. S. Ponia, S. Tripathi, V. Balasubramaniam, L. Miorin, M. Sourisseau, M. C. Schwarz, M. P. Sanchez-Seco, M. J. Evans, S. M. Best and A. Garcia-Sastre (2016). "Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling." Cell Host Microbe **19**(6): 882-890.
- Greenberg, B. M., C. Krishnan and L. Harder (2019). "New onset transverse myelitis diagnostic accuracy and patient experiences." Mult Scler Relat Disord **30**: 42-44.
- Grygorczuk, S., M. Parczewski, R. Swierzbinska, P. Czupryna, A. Moniuszko, J. Dunaj, M. Kondrusik and S. Pancewicz (2017). "The increased concentration of macrophage migration inhibitory factor in serum and cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis." J Neuroinflammation **14**(1): 126.
- Gurung, S., N. Reuter, A. Preno, J. Dubaut, H. Nadeau, K. Hyatt, K. Singleton, A. Martin, W. T. Parks, J. F. Papin and D. A. Myers (2019). "Zika virus infection at mid-gestation results in fetal cerebral cortical injury and fetal death in the olive baboon." PLoS Pathog **15**(1): e1007507.
- Hadden, R. D. and R. A. Hughes (2003). "Management of inflammatory neuropathies." J Neurol Neurosurg Psychiatry **74 Suppl 2**: ii9-ii14.
- Herrero, L. J., K. C. Sheng, P. Jian, A. Taylor, Z. Her, B. L. Herring, A. Chow, Y. S. Leo, M. J. Hickey, E. F. Morand, L. F. Ng, R. Bucala and S. Mahalingam (2013). "Macrophage migration inhibitory factor receptor CD74 mediates alphavirus-induced arthritis and myositis in murine models of alphavirus infection." Arthritis Rheum **65**(10): 2724-2736.
- Howait, M., A. Albassam, C. Yamada, H. Sasaki, L. Bahammam, M. M. Azuma, L. T. A. Cintra, A. R. Sato, S. Yamada, R. White, T. Kawai and A. Movila (2019). "Elevated Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Inflammatory Bone Resorption Induced in a Mouse Model of Periradicular Periodontitis." J Immunol.
- Jankauskas, S. S., D. W. L. Wong, R. Bucala, S. Djurdjaj and P. Boor (2019). "Evolving complexity of MIF signaling." Cell Signal.
- Kam, Y. W., J. A. Leite, F. M. Lum, J. J. L. Tan, B. Lee, C. C. Judice, D. A. T. Teixeira, R. Andreato-Santos, M. A. Vinolo, R. Angerami, M. R. Resende, A. R. R. Freitas, E. Amaral, R. P. Junior, M. L. Costa, J. P. Guida, C. W. Arns, L. C. S. Ferreira, L. Renia, J. L. Proenca-Modena, L. F. P. Ng, F. T. M. Costa and N. Zika-Unicamp (2017). "Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus-Infected Patients in Brazil." J Infect Dis **216**(2): 172-181.
- Kang, I. and R. Bucala (2019). "The immunobiology of MIF: function, genetics and prospects for precision medicine." Nat Rev Rheumatol.
- Kim, K. W. and H. R. Kim (2016). "Macrophage migration inhibitory factor: a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis." Korean J Intern Med **31**(4): 634-642.
- Krauer, F., M. Riesen, L. Reveiz, O. T. Oladapo, R. Martinez-Vega, T. V. Porgo, A. Haefliger, N. J. Broutet, N. Low and W. H. O. Z. C. W. Group (2017). "Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain-Barre Syndrome: Systematic Review." PLoS Med **14**(1): e1002203.
- Kuhn, R. J., W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. Strauss, T. S. Baker and J. H. Strauss (2002). "Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion." Cell **108**(5): 717-725.
- Lanciotti, R. S., O. L. Kosoy, J. J. Laven, J. O. Velez, A. J. Lambert, A. J. Johnson, S. M. Stanfield and M. R. Duffy (2008). "Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007." Emerg Infect Dis **14**(8): 1232-1239.

- Lazear, H. M., J. Govero, A. M. Smith, D. J. Platt, E. Fernandez, J. J. Miner and M. S. Diamond (2016). "A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis." Cell Host Microbe **19**(5): 720-730.
- Leal, M. C., L. F. Muniz, T. S. Ferreira, C. M. Santos, L. C. Almeida, V. Van Der Linden, R. C. Ramos, L. C. Rodrigues and S. S. Neto (2016). "Hearing Loss in Infants with Microcephaly and Evidence of Congenital Zika Virus Infection - Brazil, November 2015-May 2016." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **65**(34): 917-919.
- Li, F., Y. Wang, L. Yu, S. Cao, K. Wang, J. Yuan, C. Wang, K. Wang, M. Cui and Z. F. Fu (2015). "Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection." J Virol **89**(10): 5602-5614.
- Li, S., N. Armstrong, H. Zhao, W. Hou, J. Liu, C. Chen, J. Wan, W. Wang, C. Zhong, C. Liu, H. Zhu, N. Xia, T. Cheng and Q. Tang (2018). "Zika Virus Fatally Infects Wild Type Neonatal Mice and Replicates in Central Nervous System." Viruses **10**(1).
- Liu, M., S. Guo, J. M. Hibbert, V. Jain, N. Singh, N. O. Wilson and J. K. Stiles (2011). "CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications." Cytokine Growth Factor Rev **22**(3): 121-130.
- Lubetsky, J. B., A. Dios, J. Han, B. Aljabari, B. Ruzsicska, R. Mitchell, E. Lolis and Y. Al-Abed (2002). "The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents." J Biol Chem **277**(28): 24976-24982.
- Lue, H., R. Kleemann, T. Calandra, T. Roger and J. Bernhagen (2002). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease." Microbes Infect **4**(4): 449-460.
- Manangeeswaran, M., D. D. Ireland and D. Verthelyi (2016). "Zika (PRVABC59) Infection Is Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice." PLoS Pathog **12**(11): e1006004.
- Mansuy, J. M., M. Dutertre, C. Mengelle, C. Fourcade, B. Marchou, P. Delobel, J. Izopet and G. Martin-Blondel (2016). "Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen?" Lancet Infect Dis **16**(4): 405.
- Martines, R. B., J. Bhatnagar, M. K. Keating, L. Silva-Flannery, A. Muehlenbachs, J. Gary, C. Goldsmith, G. Hale, J. Ritter, D. Rollin, W. J. Shieh, K. G. Luz, A. M. Ramos, H. P. Davi, W. Kleber de Oliveria, R. Lanciotti, A. Lambert and S. Zaki (2016). "Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses--Brazil, 2015." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **65**(6): 159-160.
- Mecharles, S., C. Herrmann, P. Poullain, T. H. Tran, N. Deschamps, G. Mathon, A. Landais, S. Breurec and A. Lannuzel (2016). "Acute myelitis due to Zika virus infection." Lancet **387**(10026): 1481.
- Melchjorsen, J., L. N. Sorensen and S. R. Paludan (2003). "Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function." J Leukoc Biol **74**(3): 331-343.
- Miner, J. J., B. Cao, J. Govero, A. M. Smith, E. Fernandez, O. H. Cabrera, C. Garber, M. Noll, R. S. Klein, K. K. Noguchi, I. U. Mysorekar and M. S. Diamond (2016). "Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise." Cell **165**(5): 1081-1091.
- Mlakar, J., M. Korva, N. Tul, M. Popovic, M. Poljsak-Prijatelj, J. Mraz, M. Kolenc, K. Resman Rus, T. Vesnaver Vipotnik, V. Fabjan Vodusek, A. Vizjak, J. Pizem, M. Petrovec and T. Avsic Zupanc (2016). "Zika Virus Associated with Microcephaly." N Engl J Med **374**(10): 951-958.
- Modis, Y., S. Ogata, D. Clements and S. C. Harrison (2004). "Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion." Nature **427**(6972): 313-319.
- Moura da Silva, A. A., J. S. Ganz, P. D. Sousa, M. J. Doriqui, M. R. Ribeiro, M. D. Branco, R. C. Queiroz, M. J. Pacheco, F. R. Vieira da Costa, F. S. Silva, V. M. Simoes, M. A. Pacheco, F. Lamy-Filho,

- Z. C. Lamy and E. A. M. T. Soares de Britto (2016). "Early Growth and Neurologic Outcomes of Infants with Probable Congenital Zika Virus Syndrome." Emerg Infect Dis **22**(11): 1953-1956.
- Musso, D., T. Nhan, E. Robin, C. Roche, D. Bierlaire, K. Zisou, A. Shan Yan, V. M. Cao-Lormeau and J. Broutl (2014). "Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014." Euro Surveill **19**(14).
- Musso, D., C. Roche, T. X. Nhan, E. Robin, A. Teissier and V. M. Cao-Lormeau (2015). "Detection of Zika virus in saliva." J Clin Virol **68**: 53-55.
- Musso, D., C. Roche, E. Robin, T. Nhan, A. Teissier and V. M. Cao-Lormeau (2015). "Potential sexual transmission of Zika virus." Emerg Infect Dis **21**(2): 359-361.
- Naveca, F. G., G. S. Pontes, A. Y. Chang, G. Silva, V. A. D. Nascimento, D. Monteiro, M. S. D. Silva, L. F. Abdalla, J. H. A. Santos, T. A. P. Almeida, M. Mejia, T. G. R. Mesquita, H. V. S. Encarnacao, M. S. Gomes, L. R. Amaral, A. C. Campi-Azevedo, J. G. Coelho-Dos-Reis, L. Antonelli, A. Teixeira-Carvalho, O. A. Martins-Filho and R. Ramasawmy (2018). "Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage." Mem Inst Oswaldo Cruz **113**(6): e170542.
- Nem de Oliveira Souza, I., P. S. Frost, J. V. Franca, J. B. Nascimento-Viana, R. L. S. Neris, L. Freitas, D. Pinheiro, C. O. Nogueira, G. Neves, L. Chimelli, F. G. De Felice, E. A. Cavalheiro, S. T. Ferreira, I. Assuncao-Miranda, C. P. Figueiredo, A. T. Da Poian and J. R. Clarke (2018). "Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice." Sci Transl Med **10**(444).
- Rossi, S. L., R. B. Tesh, S. R. Azar, A. E. Muruato, K. A. Hanley, A. J. Auguste, R. M. Langsjoen, S. Paessler, N. Vasilakis and S. C. Weaver (2016). "Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus." Am J Trop Med Hyg **94**(6): 1362-1369.
- Routhu, N. K. and S. N. Byrareddy (2017). "Host-Virus Interaction of ZIKA Virus in Modulating Disease Pathogenesis." J Neuroimmune Pharmacol **12**(2): 219-232.
- Ruckert, C., J. Weger-Lucarelli, S. M. Garcia-Luna, M. C. Young, A. D. Byas, R. A. Murrieta, J. R. Fauver and G. D. Ebel (2017). "Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes." Nat Commun **8**: 15412.
- Sainaghi, P. P., L. Collimedaglia, F. Alciato, M. A. Leone, P. Naldi, R. Molinari, F. Monaco and G. C. Avanzi (2010). "The expression pattern of inflammatory mediators in cerebrospinal fluid differentiates Guillain-Barre syndrome from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy." Cytokine **51**(2): 138-143.
- Semple, B. D., K. Blomgren, K. Gimlin, D. M. Ferriero and L. J. Noble-Haeusslein (2013). "Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species." Prog Neurobiol **106-107**: 1-16.
- Shen, D., Y. Lang, F. Chu, X. Wu, Y. Wang, X. Zheng, H. L. Zhang, J. Zhu and K. Liu (2018). "Roles of macrophage migration inhibitory factor in Guillain-Barre syndrome and experimental autoimmune neuritis: beneficial or harmful?" Expert Opin Ther Targets **22**(7): 567-577.
- Sirohi, D., Z. Chen, L. Sun, T. Klose, T. C. Pierson, M. G. Rossmann and R. J. Kuhn (2016). "The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus." Science **352**(6284): 467-470.
- Soares, C. N., P. Brasil, R. M. Carrera, P. Sequeira, A. B. de Filippis, V. A. Borges, F. Theophilo, M. A. Ellul and T. Solomon (2016). "Fatal encephalitis associated with Zika virus infection in an adult." J Clin Virol **83**: 63-65.
- Song, H., Z. Zhu, Y. Zhou, N. Du, T. Song, H. Liang, X. Chen, Y. Wang, Y. Wang and Y. Hu (2019). "MIF/CD74 axis participates in inflammatory activation of Schwann cells following sciatic nerve injury." J Mol Histol.

- Souza, B. S., G. L. Sampaio, C. S. Pereira, G. S. Campos, S. I. Sardi, L. A. Freitas, C. P. Figueira, B. D. Paredes, C. K. Nonaka, C. M. Azevedo, V. P. Rocha, A. C. Bandeira, R. Mendez-Otero, R. R. Dos Santos and M. B. Soares (2016). "Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells." *Sci Rep* **6**: 39775.
- Suzuki, T., A. Ogata, K. Tashiro, K. Nagashima, M. Tamura, K. Yasui and J. Nishihira (2000). "Japanese encephalitis virus up-regulates expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) mRNA in the mouse brain." *Biochim Biophys Acta* **1517**(1): 100-106.
- Tang, H., C. Hammack, S. C. Ogden, Z. Wen, X. Qian, Y. Li, B. Yao, J. Shin, F. Zhang, E. M. Lee, K. M. Christian, R. A. Didier, P. Jin, H. Song and G. L. Ming (2016). "Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth." *Cell Stem Cell* **18**(5): 587-590.
- Tilstam, P. V., D. Qi, L. Leng, L. Young and R. Bucala (2017). "MIF family cytokines in cardiovascular diseases and prospects for precision-based therapeutics." *Expert Opin Ther Targets* **21**(7): 671-683.
- Tohidpour, A., A. V. Morgun, E. B. Boitsova, N. A. Malinovskaya, G. P. Martynova, E. D. Khilazheva, N. V. Kopylevich, G. E. Gertsog and A. B. Salmina (2017). "Neuroinflammation and Infection: Molecular Mechanisms Associated with Dysfunction of Neurovascular Unit." *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 276.
- van den Pol, A. N., G. Mao, Y. Yang, S. Ornaghi and J. N. Davis (2017). "Zika Virus Targeting in the Developing Brain." *J Neurosci* **37**(8): 2161-2175.
- van der Linden, V., A. Pessoa, W. Dobyns, A. J. Barkovich, H. V. Junior, E. L. Filho, E. M. Ribeiro, M. C. Leal, P. P. Coimbra, M. F. Aragao, I. Vercosa, C. Ventura, R. C. Ramos, D. D. Cruz, M. T. Cordeiro, V. M. Mota, M. Dott, C. Hillard and C. A. Moore (2016). "Description of 13 Infants Born During October 2015-January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **65**(47): 1343-1348.
- Venkatesan, A., A. R. Tunkel, K. C. Bloch, A. S. Luring, J. Sejvar, A. Bitnun, J. P. Stahl, A. Mailles, M. Drebot, C. E. Rupprecht, J. Yoder, J. R. Cope, M. R. Wilson, R. J. Whitley, J. Sullivan, J. Granerod, C. Jones, K. Eastwood, K. N. Ward, D. N. Durrheim, M. V. Solbrig, L. Guo-Dong, C. A. Glaser and C. International Encephalitis (2013). "Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: consensus statement of the international encephalitis consortium." *Clin Infect Dis* **57**(8): 1114-1128.
- Ventura, C. V., M. Maia, N. Dias, L. O. Ventura and R. Belfort, Jr. (2016). "Zika: neurological and ocular findings in infant without microcephaly." *Lancet* **387**(10037): 2502.
- Wang, S. S., X. Cen, X. H. Liang and Y. L. Tang (2017). "Macrophage migration inhibitory factor: a potential driver and biomarker for head and neck squamous cell carcinoma." *Oncotarget* **8**(6): 10650-10661.
- Winter, P. M., N. M. Dung, H. T. Loan, R. Kneen, B. Wills, T. Thu le, D. House, N. J. White, J. J. Farrar, C. A. Hart and T. Solomon (2004). "Proinflammatory cytokines and chemokines in humans with Japanese encephalitis." *J Infect Dis* **190**(9): 1618-1626.
- Workman, A. D., C. J. Charvet, B. Clancy, R. B. Darlington and B. L. Finlay (2013). "Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species." *J Neurosci* **33**(17): 7368-7383.
- Zwiech, R. (2015). "Macrophage migration inhibitory factor urinary excretion revisited - MIF a potent predictor of the immunosuppressive treatment outcomes in patients with proliferative primary glomerulonephritis." *BMC Immunol* **16**: 47.