

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Impacto da eferocitose de células infectadas pelo Zika vírus na ativação de células dendríticas

por

Matheus Rossi Avelar

Araraquara

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Impacto da eferocitose de células infectadas pelo Zika vírus na ativação de células
dendríticas

Dissertação de Exame de Defesa apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de
concentração: Imunologia, Curso de Mestrado,

Orientando: Matheus Rossi Avelar

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ivo de
Medeiros

Coorientadora: Dra. Pryscilla Fanini Wowk

Araraquara

2020

A948i

Avelar, Matheus Rossi.

Impacto da eferocitose de células infectadas pelo Zika vírus na ativação de células dendríticas / Matheus Rossi Avelar. – Araraquara: [S.n.], 2020.
58 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Pesquisa em Imunologia.

Orientadora: Alexandra Ivo de Medeiros.

Coorientadora: Pryscilla Fanini Wowk.

1. Vírus Zika. 2. Eferocitose. 3. Ativação celular. I. Medeiros, Alexandra Ivo de, orient. II. Wowk, Pryscilla Fanini, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



EXAME GERAL DE QUALIFICAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA.

DISCENTE: MATHEUS ROSSI AVELAR

TÍTULO DA TESE: Impacto da eferocitose de células infectadas pelo Zika vírus na ativação de células dendríticas

DATA: 20 de Dezembro de 2019 às 09:00.

LOCAL: Centro de Pesquisa da Cachaça da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

(X) APROVADO

() REPROVADO

PARECER CIRCUNSTANCIADO:

Araraquara, 20 de dezembro de 2019

Profª. Drª. Alexandra Ivo de Medeiros
Membro titular participante por vídeo-conferência

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais pela educação, conforto físico e emocional, total apoio às minhas escolhas e pela educação que me foi dada desde pequeno. Sem a Sônia e o José nada disso seria possível.

Agradeço à Alexandra por ser um exemplo de docente e orientadora. Por ter muita paciência, enorme vontade de trabalhar, ensinar e aprender, além de muita sensatez. Juntamente agradeço aos meus amigos de laboratório que aguentam o tranco comigo e me ajudaram e ensinaram inúmera vezes. Agradeço aos nossos colaboradores do Instituto Carlos Chagas, minha coorientadora Pryscilla, Allan e Juliano pela disponibilidade e paciência ao trabalharmos juntos, possibilitando a execução deste trabalho. Tudo que aprendi com vocês não cabe nesse texto. FCFAr/UNESP pelo apoio institucional e toda as equipes de administradores, limpeza, segurança, manutenção, corpo docente e discente que possibilitaram minha excelente formação como farmacêutico.

Agradeço aos meus amigos Presto, Ayumi, Marga, Wilton e João Ricardo que estão ao meu lado há muitos anos e que me deram forças e conselhos para fazer as melhores escolhas. Agradeço à Cecília por todas vezes que me acolheu e ajudou a continuar.

Por último, e um dos mais importantes, agradeço ao povo que tem tão pouco e mesmo assim tem seu suor investido no desenvolvimento do país através da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo nº 2017/19870-6, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Sumário

ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Fagocitose de células apoptóticas e ativação de linfócitos T CD4 ⁺	13
1.2. Vírus Zika e apoptose celular.....	16
2. HIPÓTESE DE ESTUDO	19
3. OBJETIVO	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Cultivo celular	21
4.2. Cultivo viral	21
4.3. Titulação dos estoques virais	22
4.4. Ensaio de infecção	23
4.5. Irradiação de UVC em células infectadas pelo ZIKV	24
4.6. Avaliação da taxa de apoptose e indução de apoptose.....	24
4.7. Ensaio de eferocitose e determinação do estado de ativação de BMDCs.....	24
4.8. Quantificação de citocinas	25
4.9. Análise dos resultados	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Taxa de infecção de diferentes linhagens celulares pelas cepas ZIKV PE243 e ZIKV MR766.	26
5.2 Taxa de infecção pela cepa ZIKV PE243 utilizando linhagens neuronais.....	28
5.3 Suscetibilidade de BMDC a infecção pelo ZIKV.....	30
5.4 Avaliação do padrão de morte celular mediante a infecção pelo ZIKV na linhagem SH-SY5Y	32
.....	35

5.5 Avaliação de fagocitose de células Huh7.5 infectadas com ZIKV por BMDC	36
5.6 Avaliação da eferocitose de células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV por BMDC.....	40
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÕES.....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS	57
Anexo A. Estratégias de “gating”.....	57

Resumo

Estudos recentes demonstram que a eferocitose de células apoptóticas infectadas por células dendríticas (CD) resulta na ativação de clones de linfócitos T CD4⁺ autorreativos e o desenvolvimento de doenças autoimunes. O processamento e apresentação de peptídeos próprios oriundos das células apoptóticas via MHC, associado a presença do patógeno, permite a indução de um fenótipo imunogênico nessas CD, e, portanto, propiciando o ambiente favorável para ativação de clones autorreativos. A infecção pelo vírus Zika (ZIKV) vem sendo amplamente estudada devido às complicações neuronais no desenvolvimento fetal e em adultos, como a microcefalia e síndrome de Guillain-Barré, respectivamente. Considerando que a infecção pelo ZIKV induz intensa morte celular por apoptose em diferentes tipos celulares, a hipótese deste estudo fundamenta-se que a fagocitose de células apoptóticas infectadas pelo ZIKV levaria a ativação de CD com um perfil imunogênico. Para investigar o efeito da eferocitose na ativação de células dendríticas, inicialmente duas cepas virais e diferentes linhagens celulares foram testadas para obtenção de células infectadas por ZIKV. O potencial de infecção das cepas virais ZIKV PE243 (linhagem asiática isolada no Brasil) e ZIKV MR766 (linhagem africana isolada em Uganda) foram testadas utilizando cinco linhagens celulares: HaCaT, A549, Huh7.5, C6 e SH-SY5Y. As linhagens HaCaT, A549 e C6 apresentaram baixa infectividade, enquanto as linhagens Huh7.5 e SH-SY5Y mostraram alta taxa de infecção pela cepa ZIKV PE234. A eferocitose de células Huh7.5 infectadas pelo ZIKV não foi capaz de induzir um aumento na expressão de moléculas de MHC-II em células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC) e apresentou uma produção mista de IL-6 e IL-10, sugerindo um perfil não definido. No entanto, a eferocitose de células da linhagem neuronal SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV levou ao aumento na expressão das moléculas CD86 e MHC-II nas BMDC, além de uma maior produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TGF- β quando comparada ao controle de células SH-SY5Y não infectadas. Esse perfil de BMDC e de citocinas inflamatórias após a eferocitose de SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV reforça nossa hipótese inicial, ou seja, que apresenta potencial para ativar células T autorreativas. No entanto, novos experimentos utilizando células T isoladas de animais transgênicos OT-II serão necessários para confirmar essa hipótese.

Palavras-chave: vírus Zika; eferocitose; ativação celular

Abstract

Recent studies show that phagocytosis of infected apoptotic cells by dendritic cells (CD) results in activation of self-reactive CD4⁺ T lymphocytes clones and the development of autoimmune diseases. The processing of self-peptides associated with the presence of the pathogen inside the apoptotic cells allows the induction of an immunogenic phenotype in these dendritic cells, thus providing a favorable environment for activation of self-reactive T CD4⁺ clones. Zika virus (ZIKV) infection has been widely studied due to neuronal complications in fetal development and in adults such as microcephaly and Guillain-Barré syndrome, respectively. Considering that ZIKV infection induces intense apoptotic cell death in different cell types, the hypothesis of this study was that the phagocytosis of ZIKV infected apoptotic cells would lead to activation of dendritic cells in an immunogenic profile. To investigate the effect of efferocytosis of infected cells on dendritic cell activation, two strains and different cell lineages were tested to obtain ZIKV infected cells. Infection potential of viral strains ZIKV PE243 (Asian strain isolated in Brazil) and ZIKV MR766 (African strain isolated in Uganda) were tested using five cell lineages: HaCaT, A549, Huh7.5, C6 e SH-SY5Y. HaCaT, A549 and C6 cell lineages showed low susceptibility to the ZIKV PE243 strain while Huh7.5 and SH-SY5Y showed high infection rate. Efferocytosis of ZIKV infected Huh7.5 cells was not able to induce an increase in MHCII molecule expression in bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) and a mixed cytokine production of IL-6 and IL-10, indicating non defined profile. However, the efferocytosis of cells from the ZIKV infected SH-SY5Y neuronal lineage caused a higher expression of CD86 and MHCII molecules in BMDC, as well as a higher production of IL-1 β , IL-6 and TGF- β cytokines when compared to uninfected SH-SY5Y cells. This immunogenic profile of BMDC and inflammatory cytokines produced after the coculture of ZIKV-infected SH-SY5Y confirms our initial hypothesis, that there is potential to activate autoreactive T cells. However, further experiments will be performed using T cells isolated from OT-II transgenic animals to confirm this hypothesis.

Keywords: Zika vírus; efferocytosis; cell activation

Lista de figuras

Figura 1: Hipótese de estudo.....	18
Figura 2: Taxa de infecção das linhagens HaCaT, A549 e Huh7.5 pelo ZIKV.....	26
Figura 3: Taxa de infecção de células das linhagens neuronais SH-SY5Y e C6 pelo ZIKV.....	28
Figura 4: Suscetibilidade de BMDC à infecção pelo ZIKV.....	30
Figura 5: Taxa de apoptose de células SH-SY5Y após infecção pelo ZIKV.....	33
Figura 6: Perfil de eferocitose de células Huh7.5 infectadas pelo ZIKV.....	36
Figura 7: Expressão de MHC-II após eferocitose de células Huh7.5 por BMDC.....	37
Figura 8: Eferocitose de células Huh7.5 infectadas pelo ZIKV induz maior produção de IL-6 e IL10.....	38
Figura 9: Células neurais infectadas com Zika não induzem aumento na taxa de eferocitose por BMDC.....	41
Figura 10: BMDC apresentam maior ativação após cocultivo com ZIKV-iAC.....	42
Figura 11. Eferocitose de SH-SY5Y ZIKV-iAC por BMDC tem maior produção de IL-1 β , IL-6 e TGF- β	43

Lista de abreviaturas

AC – Células apoptóticas

ADP - Adenosina difosfato

AMP - Adenosina monofosfato

ATP - Adenosina trifosfato

BMDC – Células dendríticas derivadas de medula óssea

BOD - Incubadora refrigerada *Bio-Oxygen Demand*

DAMP – Padrões moleculares associados ao dano

CD - Células dendríticas

CFSE - Carboxifluoresceína succinimidil éster

DTg - animais duplo transgênicos

GBS - Síndrome de Guillain-Barré

GM-CSF - Granulocyte Macrophage colony stimulating factor

iACs – células apoptóticas infectadas

IL - Interleucina

LTC - Linfócitos T citotóxicos

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MOI - Multiplicidade de infecção

OVA - Ovoalbumina

PAMP – Padrões moleculares associados ao patógeno

PFA - paraformaldeído

PGE2 - prostaglandina E2

PRR- Pattern recognition receptors

PS – Fosfatidilserina

SFB - Soro fetal bovino

TGF- β - *Tumor growing factor beta*

TNF- α - *Tumor necrosis fator alpha*

UFF - Unidades formadoras de foco

ZIKV - Vírus Zika

1. Introdução

1.1 Fagocitose de células apoptóticas e ativação de linfócitos T CD4⁺

A apoptose, morte celular programada, é um processo fisiológico que ocorre em situações homeostáticas contribuindo para o desenvolvimento e remodelamento tecidual. A fagocitose das células apoptóticas (AC), denominado eferocitose, ocorre por fagócitos profissionais, como macrófagos e células dendríticas (CD), assim como por fagócitos não profissionais, como células epiteliais, e é imprescindível para a manutenção da homeostase tecidual e prevenção de processos inflamatórios(1). Apesar do elevado número de células que entram em apoptose diariamente, essas AC raramente são encontradas no tecido, uma vez que são rapidamente removidas pelos fagócitos. Entretanto, em situações não fisiológicas, como por exemplo durante quadros de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica ou mediante a inalação de substâncias tóxicas e fumaça de cigarro, pode ocorrer o acúmulo de AC no tecido acometido (2).

O processo eficiente de eferocitose depende de fatores que facilitam o recrutamento de fagócitos e o reconhecimento efetivo das AC. No momento em que essas células iniciam o processo apoptótico, são liberados sinais solúveis quimioatraentes chamados de *find-me*, como adenosina mono, di e trifosfato (AMP, ADP e ATP), quimiocinas como a fractalcina e fosfolipídeos como a esfingosina 1-fosfato, que promovem o encontro entre os fagócitos e as AC (3).

Uma das principais moléculas envolvidas no reconhecimento de AC por fagócitos é a fosfatidilserina (PS), também conhecida como um sinal de *eat-me* (1). Esses fosfolipídeos, durante o processo de apoptose, passam a ser expostos em

maior quantidade e na forma de *cluster* na superfície externa da membrana celular (4). O reconhecimento de PS pode ocorrer pela interação com receptores como BAI 1 (*brain specific angiogenesis inhibitor 1*), stabilin 2 (5), RAGE (*Receptor for advanced glycation end products*) (6) e TIM1/3/4 (*T cell immunoglobulin mucin domain*) (7, 8). Greenberg, et al. (9) demonstraram que o receptor *scavenger* CD36 também está envolvido nos processos de eferocitose via moléculas de PS oxidadas, assim como outros receptores *scavenger*, como SR-A, SR-B (10).

A fagocitose de AC não infectadas resulta na liberação de mediadores antiinflamatórios como TGF- β (*tumor growing fator beta*), interleucina (IL) 10, prostaglandina E₂ (PGE₂) e fator de ativação plaquetária, assim como na inibição de mediadores inflamatórios como TNF- α (*tumor necrosis fator alpha*), IL-1, IL-8 e leucotrieno C4 (11, 12).

Além das condições fisiológicas e doenças inflamatórias estéreis, o acúmulo de AC também ocorre durante processos infecciosos. A entrada de microrganismos nos tecidos induz um intenso influxo de neutrófilos e monócitos que, após fagocitarem o patógeno e exercerem suas funções efectoras morrem contendo em seu interior o patógeno ou fragmentos de patógenos, PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*). Tem sido demonstrado que os patógenos podem induzir diferentes padrões de morte celular, como a apoptose, necrose ou piroptose (13) e que a fagocitose dessas células mortas infectadas pode levar a ativação de macrófagos, assim como de CD e linfócitos (14-16).

Dados recentes obtidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram, *in vitro* e *in vivo*, que a fagocitose de células apoptóticas infectadas (iACs) com *Escherichia coli*, por CD, resulta na produção de IL-1 β , IL-6, TGF- β e IL-23. Além disso, essas CD são

mais hábeis em migrar para os linfonodos quando comparados à fagocitose de AC não infectadas (16).

Ao fagocitar os corpos apoptóticos infectados, os receptores de reconhecimento padrão (PRR), que são recrutados para o fagossoma durante o processo eférico, reconhecem os PAMPs e, conseqüentemente, induzem a maturação de CD aumentando a expressão de moléculas co-estimuladoras que, associadas à maior apresentação de peptídeos antigênicos em moléculas do Complexo principal de histocompatibilidade (MHC), levam à ativação de linfócitos T e a indução da resposta adaptativa (17). Subramanian e colaboradores demonstraram que a fagocitose de células apoptóticas infectadas com vírus Herpes Simplex 1, por CD CD11c⁺CD8α⁺, resulta na ativação das mesmas e apresentação de peptídeos virais tanto via de MHC II, quanto via MHC I, através de apresentação cruzada, induzindo a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ capazes de controlar a replicação viral (18, 19).

Durante o processamento das iAC, a CD é capaz de apresentar tanto peptídeos oriundos do patógeno quanto peptídeos próprios provenientes da iAC, uma vez que são processados da mesma forma sem distinção (20). A apresentação desses peptídeos próprios associados ao microambiente inflamatório proveniente do quadro infeccioso pode ter uma resposta indesejada. A infecção por *Citrobacter rodentium* é conhecida por induzir apoptose nas células do cólon de camundongos, levando a um quadro de colite infecciosa. Utilizando animais transgênicos que suas células expressam peptídeos de ovoalbumina (OVA) e infectados por *C. rodentium*, ao receberem linfócitos TCD4⁺ de animais OT-II, Campisi e colaboradores demonstraram que, além da ativação de clones específicos para o patógeno, clones autorreativos também foram ativados apenas após a infecção. Ainda, 60% destes

animais transgênicos desenvolveram colite autoimune e apresentaram anticorpos IgA específicos para OVA. Para comprovar o efeito da eferocitose nesse processo, a inibição farmacológica da fagocitose de células apoptóticas do cólon diminuiu drasticamente a diferenciação de linfócitos Th17 autorreativos (21). Desta forma, considerando que o desenvolvimento de autoimunidades pode ser desencadeado a partir de quadros de infecção, este estudo demonstrou pela primeira vez, que a fagocitose e processamento iAC leva à apresentação de peptídeos próprios, que em microambiente inflamatório, associado a predisposições genéticas, poderia favorecer o desenvolvimento de autoimunidades.

1.2. Vírus Zika e apoptose celular

O Zika (ZIKV) é um vírus membro da família Flaviviridae e sua transmissão em humanos ocorre principalmente pela picada de insetos vetores (mosquitos do gênero *Aedes spp.* infectados) e por vias menos recorrentes, como a transmissão congênita, sexual e por transfusão de sangue (22, 23). A infecção em adultos é caracterizada por dores de cabeça leves, febre baixa, mal-estar, dores leves nas articulações, conjuntivite, coceira e exantema maculopapular. Em gestantes infectadas pode ocorrer a transmissão vertical do vírus e os fetos podem desenvolver a síndrome congênita do vírus Zika, com apresentação de microcefalia e outras alterações durante o desenvolvimento neurológico (24). Embora indivíduos infectados possam ser assintomáticos ou apresentar apenas sintomas brandos da doença, a infecção tem ganhado atenção pelos casos de transmissão congênita e complicações neurológicas, mesmo que ainda não comprovada a correlação, tais como a síndrome de Guillain-Barré (GBS) e encefalomielite disseminada aguda (25, 26).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o ZIKV infecta diferentes linhagens celulares e múltiplos tecidos do hospedeiro, utilizando de linfonodos e do líquido cefalorraquidiano como “santuários” anatômicos para persistir e evadir das respostas de defesa do organismo (27, 28). Além disso, o ZIKV também é capaz de infectar células precursoras neurais, causando a morte destas células por apoptose via ativação do receptor Toll-like-3 e caspase-3 e, dessa forma, compromete o ciclo celular e o desenvolvimento das mesmas (29, 30).

A infecção preferencial de células progenitoras neurais está possivelmente relacionada à alta expressão do receptor Axl tirosina quinase, da família de receptores TAM, na membrana celular o qual é necessário para a entrada do vírus e também para a modulação da resposta imune inata nessas células. A atividade quinase da Axl leva a supressão da via de sinalização de interferon tipo 1, a qual é importante na defesa contra infecções por vírus (31, 32). Recentemente, foi demonstrada a importância da participação do receptor Axl também na indução da apoptose da microglia de camundongos infectados, em que animais *lfnar^{-/-}/Axl^{-/-}*, deficientes para os receptores de Interferon e Axl, infectados apresentam maior sobrevivência e menor patogênese(33). Além disso, foi demonstrado que as células da epiderme e derme, incluindo macrófagos e células dendríticas residentes, tecido em que ocorre a picada do mosquito e entrada do vírus, são permissivas a infecção pelo ZIKV (34, 35).

Até o momento, não há estudos que correlacionem o intenso acúmulo de células neuronais apoptóticas durante a infecção por ZIKV e uma possível ativação de clones de linfócitos T autorreativos, que justifique o desenvolvimento de neuropatias, como a GBS (26, 36). A GBS é uma polirradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória aguda, a qual pode ocorrer após quadros de infecções bacterianas, como *Campylobacter jejuni*, e virais, incluindo vírus dengue (DENV) e

ZIKV (37). Na maioria dos casos, destaca-se o papel de autoanticorpos antiglicolipídeos, favorecendo a destruição de neurônios periféricos. Entretanto, nos casos de GBS relacionados à infecção pelo ZIKV, menos de 50% dos indivíduos apresentam autoanticorpos, sugerindo a participação de outros componentes nessa neuropatia (38). Recentemente foi demonstrada que a infecção *ex vivo* de neurônios sensoriais periféricos de camundongos adultos resulta em um aumento de morte de células da glia por duas cepas africanas de ZIKV, reforçando um possível envolvimento da eferocitose dessas iACs com o desenvolvimento de GBS (39).

A resposta de linfócitos T citotóxicos (LTC) durante a infecção pelo ZIKV foi prioridade nos estudos realizados até o momento e poucos trabalhos analisaram a ativação de células T CD4⁺ (40). Pardy e colaboradores demonstraram que, em camundongos adultos, a infecção pelo ZIKV induz uma resposta do padrão Th1, com células produtoras de IFN- γ e TNF- α , que contribuem com a ativação robusta de LTC (41). Entretanto, apesar dos relatos de desenvolvimento de neuropatias associadas à infecção pelo ZIKV e a indução de apoptose em células infectadas, ainda não foi estabelecida uma possível correlação entre a eferocitose de iAC por CD e a ativação de clones de linfócitos T CD4⁺ autorreativos, favorecendo o desenvolvimento de autoimunidades.

2. Hipótese de estudo

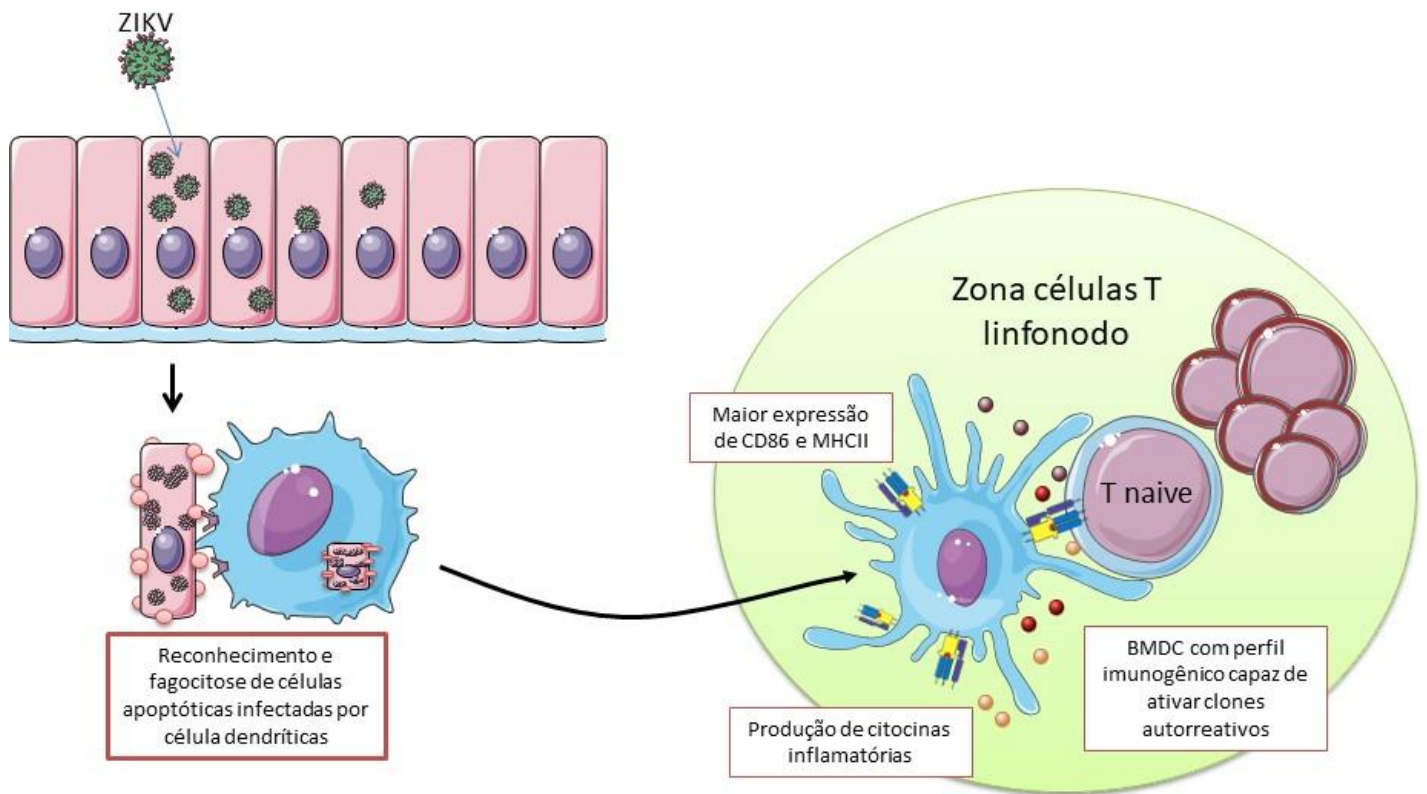


Figura 1. Hipótese de estudo. Neste estudo que pós a eferocitose de células apoptóticas infectadas pelo vírus Zika, as células dendríticas apresentariam um perfil imunogênico, sugerindo que seriam capazes de ativar de clones autorreativos de linfócitos T CD4+.

3. Objetivo

Avaliar o perfil de ativação de BMDC após a fagocitose de células apoptóticas infectadas pelo ZIKV.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a infectividade pelas cepas PE243 e MR766 de Zika vírus nas linhagens celulares HaCaT, Huh7.5, A549, C6 glia e SH-SY5Y;
2. Caracterizar o perfil de ativação e maturação das BMDC durante o processo de fagocitose de células apoptóticas infectadas pelo ZIKV.

4. Material e métodos

4.1. Cultivo celular

Células HaCaT (RRID:CVCL_0038), A549 (ATCC® CCL-185™), C6 glia (ATCC® CCL-107™) e Huh7.5 (RRID:CVCL_7927) foram mantidas em meio DMEM (Lonza) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% e gentamicina (Gibco) 0,1% em incubadora à 37°C e 5% CO₂. A linhagem celular SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) foi mantida em meio DMEM-F12 (Lonza) suplementado com SFB 10% e gentamicina 0,1%. As células oriundas de *Aedes albopictus* C6/36 foram mantidas em meio Leibovitz's L-15 suplementado com SFB 10%, triptose e gentamicina em incubadora “Bio-Oxygen Demand” (BOD) à 28°C.

Células dendríticas foram diferenciadas de medula óssea (BMDC) a partir da extração de células progenitoras da medula de tíbia e fêmur de camundongos C57BL/6J, com aproximadamente 5-8 semanas, na presença de *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) 20 ng/mL por 7 dias e 1x10⁶ células/mL, com troca de meio nos 3º e 6º, suplementado com SFB 10% e gentamicina 0,1% (42). A utilização dos animais foi aprovada pelo Comitê de Ética CEUA/FCFAR 08/2018.

4.2. Cultivo viral

Durante o estudo foram utilizadas duas cepas do ZIKV: PE243 de linhagem asiática e isolada no Estado de Pernambuco, Brasil no ano de 2015 e a cepa original do vírus, MR766 de linhagem africana, isolada em Uganda em 1947. As cepas foram cedidas pelo Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz - Paraná. Células C6/36 foram cultivadas em meio completo SFB 10% em BOD a 28°C

até atingir a confluência de 70%. As garrafas de cultura T175 foram lavadas duas vezes com PBS e inóculos das cepas ZIKV PE243 e ZIKV MR766, foram utilizados separadamente, para infectar (MOI 0,1) as células durante 7 dias à 28°C. O sobrenadante da garrafa foi centrifugado, dividido em alíquotas e congelado a -80°C. Uma terceira garrafa de cultivo de células C6/36, não infectadas com meio L-15 completo, foi mantida concomitante às garrafas infectadas. O sobrenadante da cultura não infectada (Mock) também foi centrifugado, dividido em alíquotas de congelado a -80°C. O Mock foi utilizado como controle negativo durante todo o trabalho.

4.3. Titulação dos estoques virais

Um total de 1×10^5 células C6/36 por poço foi adicionado a placas de 24 poços e, após aderência por 24h, uma alíquota de cada estoque viral foram diluídas em meio L-15 sem soro de forma seriada até a diluição final de 10^{-9} . Uma alíquota de cada diluição viral, Mock ou somente meio foi adicionada às placas em duplicata e incubadas por 1 hora em BOD a 27°C. Após a incubação, o sobrenadante foi retirado e adicionado o meio de cobertura (1:1 de meio L-15, 10% SFB, 0,52% triptose, 0,5 µg/mL gentamicina e carboximetilcelulose 3,2%) para que a disseminação das partículas virais ocorresse horizontalmente apenas, permitindo a formação de focos e a leitura correta da titulação. Após incubação de 7 dias a 27°C em BOD., o meio de cobertura foi retirado, os poços foram lavados com PBS e paraformaldeído (PFA) 3% foi adicionado e as células foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente para fixação das células e inativação das partículas virais. Os poços foram lavados com PBS e 0,5% Triton X-100 em PBS foi adicionado por 4 minutos para permeabilização celular. Em seguida, as células foram lavadas, tratadas com o anticorpo 4G2 (anti-proteína E de Flavivírus) primário (1:400) por 1 hora a 37°C e em seguida incubadas

com anticorpo secundário anti-IgG camundongo conjugado com fosfatase alcalina na diluição de 1:7500 por 1 hora a 37°C e 5% CO₂. Após a revelação com solução NBT:BCIP em tampão para reação de fosfatase alcalina, as unidades formadoras de foco (UFF) foram contadas e a titulação calculada utilizando a fórmula:

$$\frac{UFF}{mL} = \frac{\text{média nº focos}}{\text{volume do inóculo (mL)}} \times \text{fator de diluição}$$

4.4. Ensaio de infecção

Os ensaios de infecção foram realizados utilizando células de linhagem HaCaT, A549, Huh7.5, C6 e SH-SY5Y com as duas cepas do vírus, ZIKV PE243 e ZIKV MR766. 10⁵ células/poço foram adicionadas em placa de 24 poços durante 24 horas. Após aderência, os poços foram lavados e os inóculos virais foram adicionados em MOI 0.1, 1 e 10 por 1:30 h a 37°C e 5% CO₂ e retirado o inóculo. Novo meio completo foi adicionado e após 24, 48 e 72 h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, as células foram lavadas com PBS, e então tripsinizadas 0,25%. Posteriormente, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços de fundo “U”, centrifugada e o sobrenadante desprezado. As células foram recuperadas, fixadas e permeabilizadas utilizando o kit de CytoFix e CytoPerm (BD Biosciences) seguindo as especificações do fabricante. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpo 4G2-FITC (1:600). A taxa de infecção foi verificada por citometria de fluxo (BD FACSCanto e BD FACSVerse).

4.5. Irradiação de UVC em células infectadas pelo ZIKV

Com o intuito de induzir e padronizar a apoptose em células infectadas, foi realizada a irradiação com ultravioleta C (UVC) 5mJ utilizando o equipamento Bio-Link (Vilber Lourmat). Após a irradiação, as células foram incubadas por 4 horas para que houvesse as células tivessem uma taxa de apoptose (Anexina-V+) e necrose (7AAD+) padronizada, a qual foi avaliada por citometria de fluxo.

4.6. Avaliação da taxa de apoptose e indução de apoptose

A porcentagem de morte celular (apoptose/necrose) foi avaliada após 24, 48 e 72 horas de infecção pela marcação Anexina-V-FITC e 7-AAD (BD Biosciences) e a aquisição realizada em citômetro de fluxo (BD FACSCanto e BD FACSVerse).

4.7. Ensaio de eferocitose e determinação do estado de ativação de BMDCs

Para avaliação da eferocitose, após o período de infecção, as células apoptóticas infectadas pelo ZIKV e células apoptóticas não infectadas foram divididas pela metade. 50% das células foram marcadas com carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (5uM), cocultivadas com BMDC na proporção de 1 BMDC para 3 células apoptóticas (1:3), e incubadas 18 horas. Após esse período, as células foram marcadas com o corante *Fixable Viability Stain 780* para avaliar a viabilidade das CD e excluir células mortas. Após a marcação, as Cd foram fixadas com PBS/PFA 4% por 15 minutos a 4°C e feita marcação com anticorpos anti-CD11c por 40 minutos a 4°C para avaliar a taxa de eferocitose por BMDC. O restante das iACs foram cocultivadas com BMDC por 18 horas, marcadas com *Fixable Viability Stain 780* por 10 minutos a temperatura ambiente e fixadas com PFA 4% por 15 minutos a 4°C. Foi feito o

bloqueio prévio de ligações inespecíficas prévio com FcBlock (BD Biosciences) por 15 minutos a 4°C e foram utilizados os anticorpos anti-CD11c, anti-Ia[b] (MHC de classe II) e anti-CD86 em SFB 2% por 40 minutos a 4°C.

As etapas de infecção e marcação com CFSE do ensaio de eferocitose da linhagem SH-SY5Y foram realizadas no Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas em Curitiba e então fixação com PFA 4% para realização dos ensaios de cocultura.

4.8. Quantificação de citocinas

Após 18h de cocultura, o sobrenadante foi recolhido para quantificação de citocinas produzidas por BMDC durante a eferocitose de células apoptóticas infectadas. A quantificação foi realizada pelo método de ELISA utilizando os kits de IL-1 β (BD Biosciences – limite de detecção 1000 – 15,62 pg/ml), IL-6 (BD Biosciences – limite de detecção 1000 – 15,62 pg/ml), TGF- β (R&D – limite de detecção 2000 – 31,25 pg/ml), TNF- α (BD Biosciences – limite de detecção 1000 – 15,62 pg/ml) e IL-10 (BD Biosciences – limite de detecção 2000 – 31,25 pg/ml) , leitura da absorbância em 450nm foi mensurada em um leitor de placas Epoch (Biotek).

4.9. Análise dos resultados

A análise dos dados de citometria de fluxo foi feita pelo software FCS Express 4 (De Novo) ou FlowJo (Tree Star). Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Prism 6.0 (GraphPad Software). Para as comparações entre dois grupos experimentais foram utilizados o teste de Student's t e para as comparações entre três ou mais grupos experimentais foi aplicado a análise de variância ANOVA

seguido de teste de comparação múltipla Dunnett ou Tukey. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

5. Resultados

5.1. Taxa de infecção de diferentes linhagens celulares pelas cepas ZIKV PE243 e ZIKV MR766.

Para obtenção das células apoptóticas infectadas com vírus ZIKA (ZIKV-iAC) foi necessário avaliar a suscetibilidade à infecção pelo vírus utilizando diferentes linhagens celulares. Para tanto, as linhagens HaCaT, A549, Huh7.5 humanas foram testadas quanto a infectividade pelo ZIKV. Para a padronização da infecção nessas linhagens celulares foram utilizados diferentes MOI por um período de 24 e 48 horas. A porcentagem de células positivas para o ZIKV foi avaliada pela marcação intracelular, utilizando o anticorpo 4G2-FITC, específico para proteína E de flavivírus.

Inicialmente, foi avaliada a infecção da linhagem celular HaCaT pela cepa ZIKV PE243, a qual apresentou uma baixa porcentagem de células positivas para FITC (aproximadamente 3%), independente do MOI utilizado (Fig. 2A). Em relação a infectividade das células A549 pelas cepas virais ZIKV PE243 e ZIKV MR766, utilizando MOI de 0,1, 1 e 10, foi observada uma maior suscetibilidade à infecção utilizando o MOI de 10, com 31,4% para ZIKV PE243 e 41% para ZIKV MR766 (Fig. 2B). A linhagem Huh7.5 apresentou a maior taxa de infecção, quando comparada a outras linhagens, sendo 50,23% para ZIKV PE243 e 78,43 para ZIKV MR766, utilizando o MOI 0,1 (Fig. 2C).

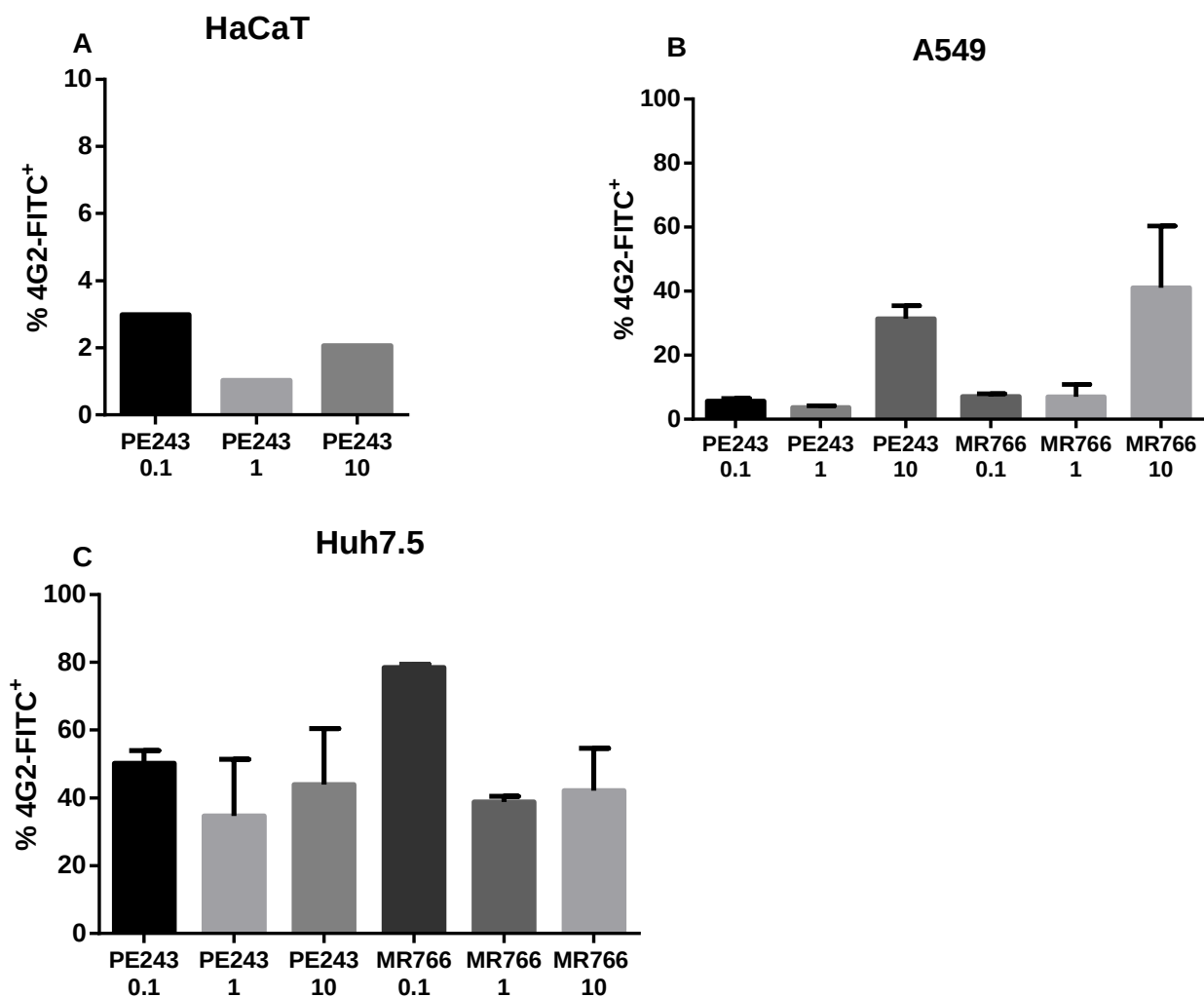


Figura 2. Taxa de infecção das linhagens HaCaT, A549 e Huh7.5 pelo ZIKV. Células das linhagens HaCaT, A549 e Huh7.5 submetidas à infecção com as cepas ZIKV PE243 e ZIKV MR766 de ZIKV por 48h e MOI de 0,1, 1 e 10. As células foram marcadas intracelularmente com anticorpo 4G2-FITC e analisadas por citometria de fluxo. As taxas de infecção são representadas pela porcentagem de células FITC⁺. Resultado de um experimento em triplicata para as linhagens Huh7.5 e A549; e para HaCaT um experimento somente.

5.2 Taxa de infecção pela cepa ZIKV PE243 utilizando linhagens neuronais

Optamos por avaliar a suscetibilidade de linhagens neuronais ao ZIKV devido a nossa hipótese de estudo que visa correlacionar uma possível associação na ativação das células T autorreativas por células dendríticas durante os processos de eferocitose desencadeando, portanto, neuropatias associadas ao ZIKV. Duas linhagens neuronais foram avaliadas, a SH-SY5Y, linhagem de neuroblastoma humano e que já teve suscetibilidade demonstrada previamente (43), e a C6, linhagem de glioma de rato. Apenas a cepa ZIKV PE234 foi utilizada nos experimentos subsequentes devido a associação com o desenvolvimento de neuropatias, fenômeno não observado com a cepa ZIKV MR766.

A suscetibilidade a infecção pela cepa ZIKV PE234 em ambas linhagens foi determinada utilizando MOI de 1 e/ou 10, nas subsequentes 48 horas de infecção. A linhagem C6 foi avaliada somente com MOI de 10 a fim de induzir o máximo de infecção e foi observado 14,02% de células 4G2-FITC. As células SH-SY5Y mostraram-se mais suscetíveis a infecção por PE243 após 48h, apresentando 78,19% e 71,58% de positividade para 4G2-FITC utilizando MOI de 1 e 10, respectivamente.

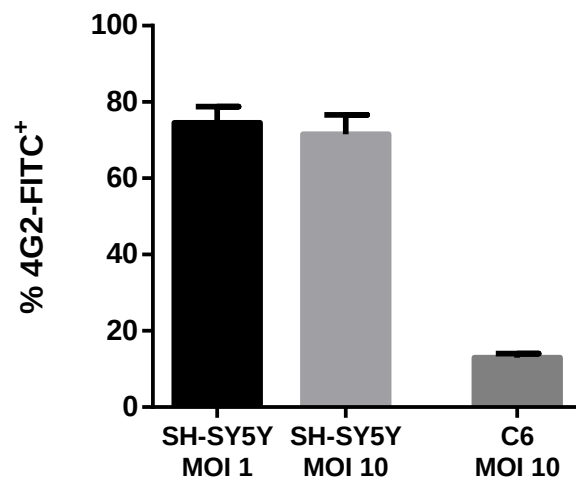


Figura 3. Taxa de infecção de células das linhagens neuronais SH-SY5Y e C6 pelo ZIKV. Células das linhagens C6 e SH-SY5Y submetidas à infecção com a cepa ZIKV PE243 por 48h. As células foram marcadas intracelularmente com anticorpo 4G2-FITC e analisadas por citometria de fluxo. A taxa de infecção é representada pela porcentagem de células FITC⁺. Resultado de dois experimentos independentes feitos em triplicata técnica para a linhagem SH-SY5Y; para linhagem C6 um experimento em duplicata técnica.

5.3 Suscetibilidade de BMDC a infecção pelo ZIKV

Foi demonstrado que as CD humanas são suscetíveis a infecção pelo ZIKV, podendo funcionar como reservatório para o vírus e, portanto, serem ativadas devido a infecção pelo vírus. Portanto, além das linhagens celulares, a suscetibilidade de BMDC à infecção por ZIKV foi também avaliada, uma vez que, durante o cocultivo de ZIKV-iAC, poderia ocorrer a infecção direta pelo vírus, representando uma crítica inerente a essa condição experimental. Dessa forma, BMDC foram incubadas com ambas as cepas, ZIKV PE243 e ZIKV MR766, utilizando MOI de 10, por 48 horas. A infectividade das cepas de ZIKV nessas células foi inferior a 1% (Fig. 4), descartando, portanto, a possibilidade da infecção direta em células dendríticas de camundongos C57BL/6J durante a eferocitose de células infectadas, e, portanto, uma possível indução da ativação de BMDC

Mediante aos resultados obtidos, as linhagens HaCaT, A549 e C6 glia não foram utilizadas nos experimentos subsequentes devido à baixa suscetibilidade a ambas cepas do ZIKV. No entanto, as taxas de infecção pela cepa ZIKV PE243 nas linhagens Huh7.5 e SH-SY5Y mostraram-se promissoras para dar continuidade aos experimentos de eferocitose.

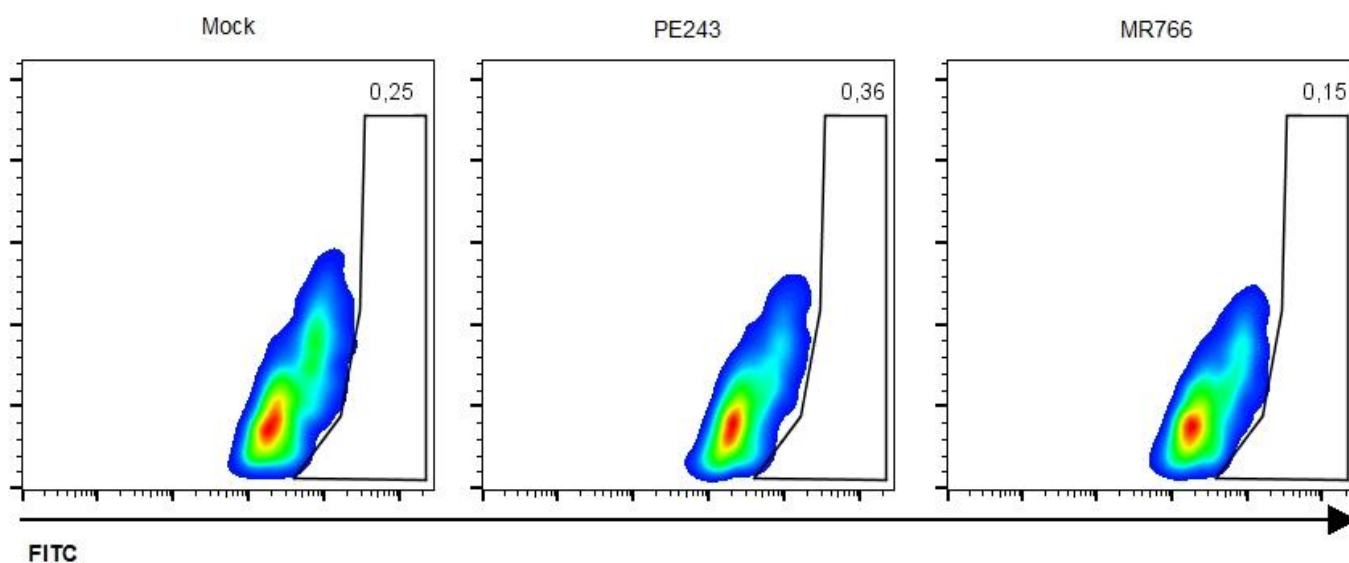


Figura 4. Suscetibilidade de BMDC à infecção pelo ZIKV. BMDC foram submetidas à infecção com cepas ZIKV PE243 e ZIKV MR766 por 48h e MOI de 10. As células foram marcadas intracelularmente com anticorpo 4G2-FITC. Os resultados foram analisados por citometria de fluxo para positividade em FITC e a taxa de infecção estão representadas nos gráficos de densidade pela porcentagem de células FITC⁺. Um experimento realizado em duplicata.

5.4 Avaliação do padrão de morte celular mediante a infecção pelo ZIKV na linhagem SH-SY5Y

Estudos prévios demonstram que a infecção pelo ZIKV induz apoptose em alguns tipos celulares, principalmente as células neuronais (44, 45). Após comprovar a suscetibilidade da linhagem SH-SY5Y ao ZIKV, o próximo passo foi determinar a taxa de apoptose e necrose dessas células infectadas em diferentes tempos de infecção. Utilizando a cepa ZIKV PE243 e MOI de 1, o padrão de morte celular foi avaliado utilizando a marcação de Anexina-V e 7AAD. A apoptose precoce é representada por $An^+/7AAD^-$ (Fig. 5A), a apoptose tardia por $An^+/7AAD^+$ (Fig. 5B) e a necrose celular por $An^-/7AAD^+$ (Fig. 5C). A porcentagem de células viáveis foi considerada por $An^-/7AAD^-$ (Fig. 5D). Ao contrário do esperado, a infecção pelo ZIKV não resultou no aumento significativo na morte celular, apoptose ou necrose, nas primeiras 72 h de infecção, quando comparado a condição de células cultivadas apenas na presença de Mock (realizado em placas de 24 poços).

Devido à necessidade de grande quantidade de células apoptóticas para realização dos ensaios de cocultura, o ensaio de infecção foi escalonado para garrafas de cultivo de 150 cm² para obtenção de ZIKV-iAC e o padrão de morte celular foi novamente avaliado após 48h de infecção. Foi observada uma tendência de aumento na taxa de apoptose na linhagem SH-SY5Y, quando comparado ao Mock. Além disso, após 48 h de infecção na linhagem SH-SY5Y a taxa de células viáveis ($An^-/7AAD^-$) foi maior na condição Mock quando comparado a condição infectada. Ao utilizar a garrafa de cultivo para infectar as células, diminuimos a morte celular induzida por outros fatores que não a infecção por ZIKV. Não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de células apoptóticas tardias e necróticas ($An^+/7AAD^+$ e $An^-/7AAD^+$).

/7AAD+) entre as condições experimentais utilizando células infectadas com ZIKV ou incubadas com Mock.

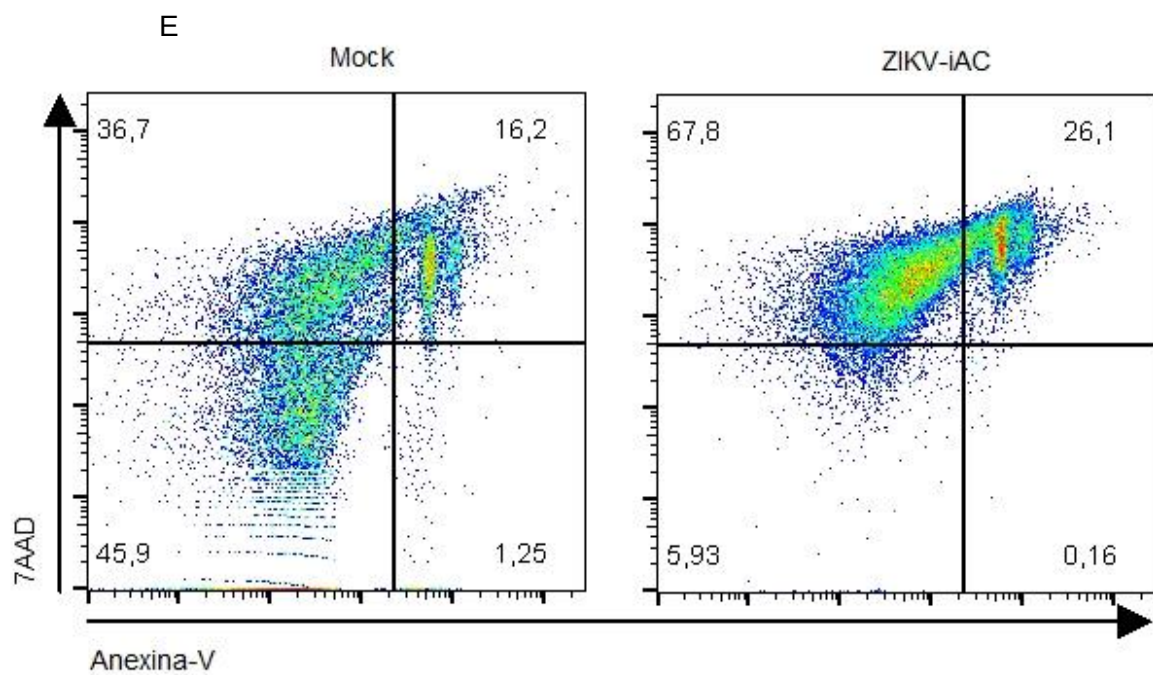
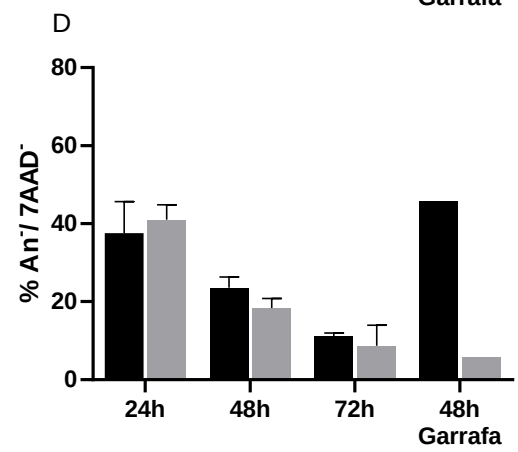
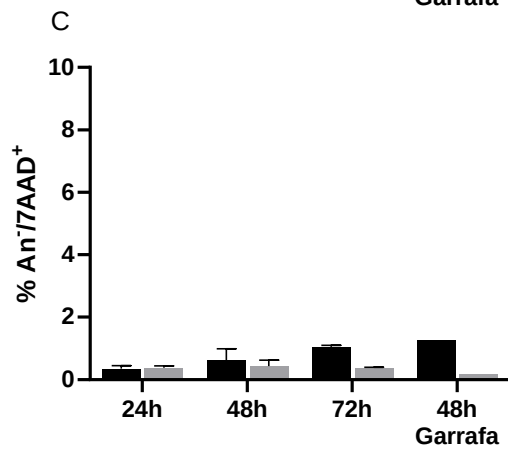
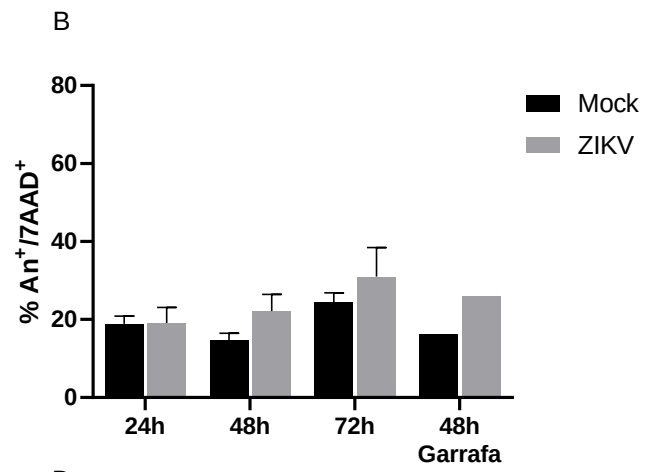
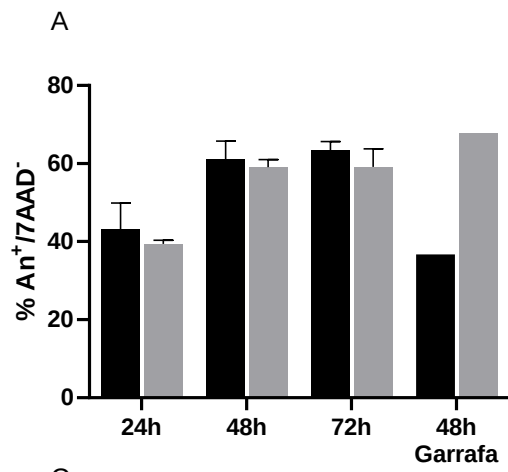


Figura 5. Taxa de apoptose de células SH-SY5Y após infecção pelo ZIKV. Células da linhagem SH-SY5Y foram submetidas à infecção com a cepa ZIKV PE243 por 24, 48 e 72h (MOI de 1). **(a-d)** As células foram marcadas com Anexina-V e 7AAD e analisadas por citometria de fluxo. Dados de um experimento em triplicata. **(e)** Gráfico de densidade representativo das condições Mock e ZIKV-iAC da garrafa de cultura após 48h.

5.5 Avaliação de fagocitose de células Huh7.5 infectadas com ZIKV por BMDC

Após obter uma alta taxa de infecção da cepa ZIKV PE243 na linhagem Huh7.5, foi realizado um ensaio de eferocitose por BMDC concomitante a determinação do padrão de morte celular após infecção e irradiação UVC. As células da linhagem Huh7.5 foram infectadas utilizando MOI de 10 por 24 h, irradiadas e então cocultivadas com BMDC, por 18 h. Como controle, as células infectadas ou incubadas com Mock foram submetidas a irradiação para determinar a porcentagem de morte celular nas diferentes condições experimentais. Entretanto, não foi possível avaliar a morte celular após as 24h devido a problemas na marcação de Anexina-V e 7-AAD.

Diferente do que esperávamos inicialmente, a taxa de eferocitose de células Huh7.5 infectadas (ZIKV e ZIKV-UVC) foi semelhante a eferocitose de células na presença de Mock. Entretanto, observamos uma tendência de aumento na eferocitose de células na presença de Mock irradiadas com UVC (Mock-UVC), sugerindo que tanto a infecção, quanto o tratamento das células infectadas com 5 mJ de UVC não induziu um aumento na expressão de moléculas de PS e com isso, uma menor taxa de eferocitose (Fig. 6). No entanto, não houve diferença na porcentagem de CD duplo positivas (CD11c+/MHCII+) após a eferocitose de ZIKV-UVC, quando comparado com a condição Mock-UVC. A *Median Fluorescent Intensity* (MFI) observada indica uma diminuição na expressão de MHC-II em células CD11c+ após a eferocitose de AC-UVC, em comparação as outras condições experimentais (dados não mostrados).

Além disso, para avaliar o perfil de ativação de BMDC após a eferocitose, as citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram quantificadas no sobrenadante das coculturas pelo método de ELISA (Fig. 8). Independente da irradiação com UVC, a eferocitose de células infectadas por BMDC resultou em uma tendência de aumento na produção de IL-6 e IL-10, quando comparado com as condições de eferocitose de células não

infectadas (Mock e Mock-UVC). O aumento nos níveis dessas citocinas mostrou-se ainda mais pronunciado em relação a IL-10, visto que foi observado um aumento de 3-4 vezes, quando comparado com as condições de células infectadas (ZIKV e ZIKV-UVC), em relação ao cocultivo com células não infectadas (Mock e Mock-UVC).

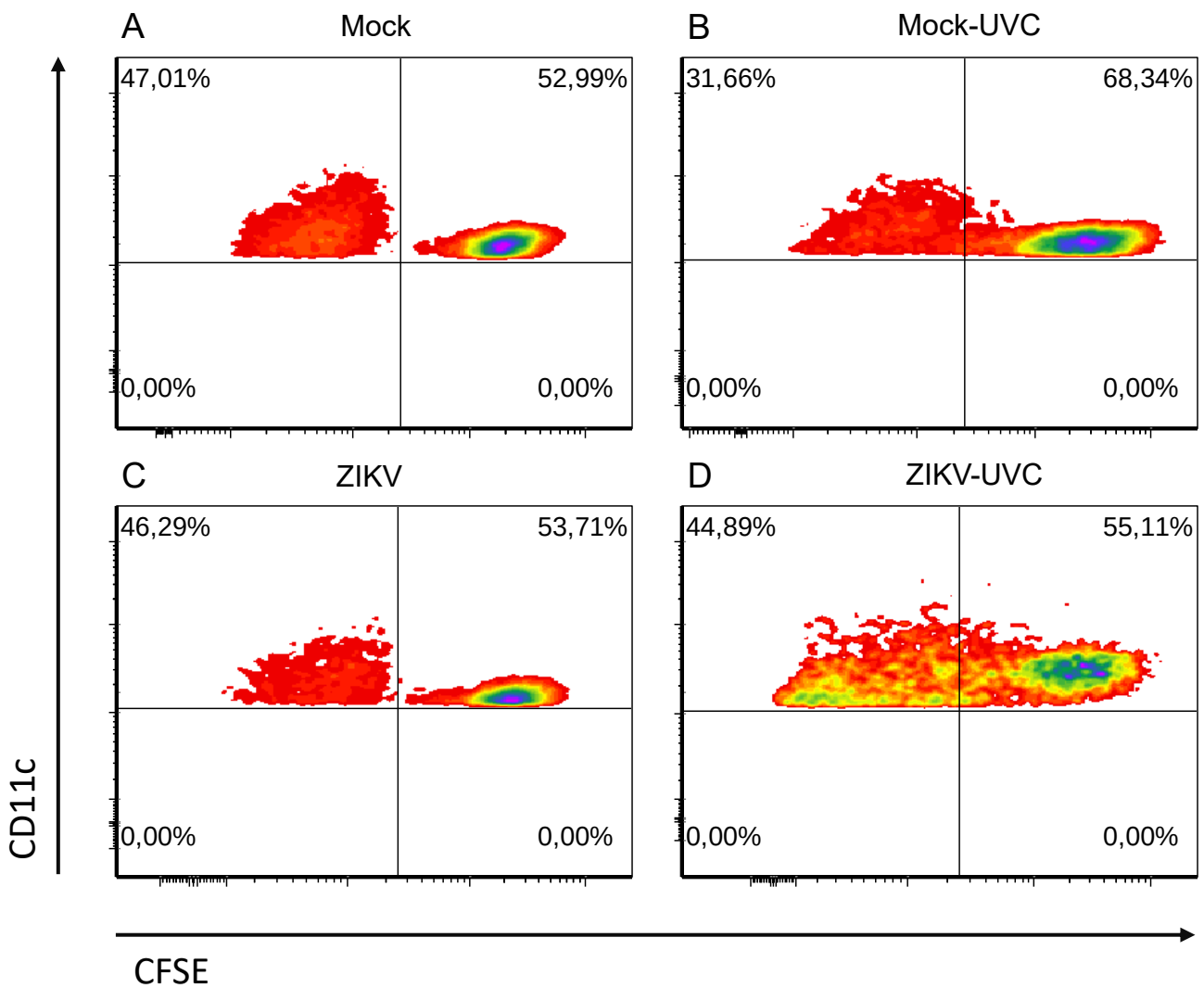


Figura 6. Perfil de eferocitose de células Huh7.5 infectadas pelo ZIKV. Células na presença de Mock (Mock), células na presença de Mock e irradiadas com UVC (Mock-UVC), células infectadas (ZIKV) e células infectadas e irradiadas com UVC (ZIKV-UVC) foram previamente marcadas com CFSE e cocultivadas com BMDC por 18h. A taxa de eferocitose foi avaliada por citometria de fluxo, indicada pela porcentagem de células CD11c positivas para CFSE. Dados representados em gráficos de densidade obtidos de um experimento.

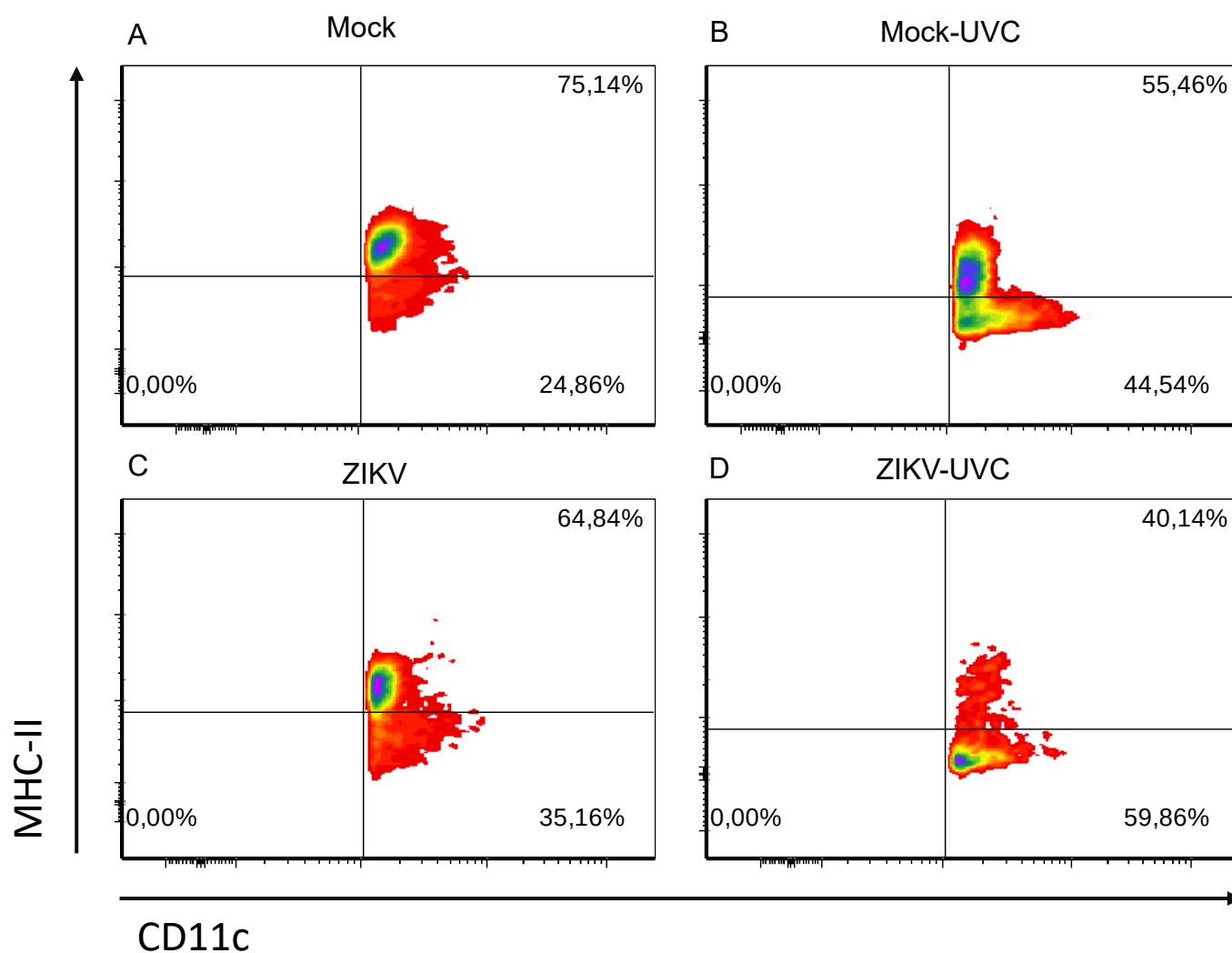


Figura 7. Expressão de MHC-II após eferocitose de células Huh7.5 por BMDC. Mock, Mock-UVC, ZIKV e ZIKV-UVC foram co-cultivadas com BMDC e a ativação foi demonstrada pelo (MFI) de (I-A(b)). Foi feito um *gating* de BMDC viáveis para analisar sua ativação através do MFI. Dados referentes a um experimento sem replicata experimental.

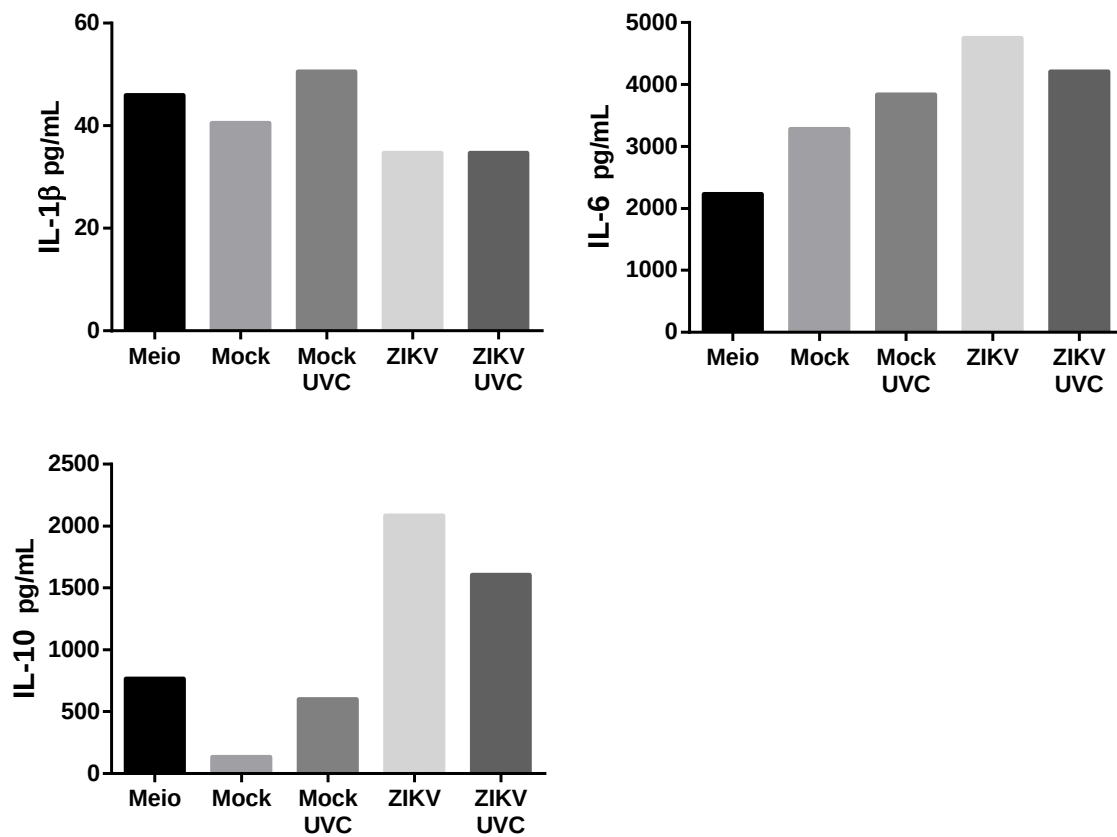


Figura 8. Eferocitose de células Huh7.5 infectadas pelo ZIKV induz maior produção de IL-6 e IL10. Mock, Mock-UVC, ZIKV e ZIKV-UVC foram cocultivadas com BMDC. Os sobrenadantes da cocultura foram utilizados para quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 por ELISA. Dados referente a um experimento sem replicata experimental.

5.6 Avaliação da eferocitose de células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV por BMDC

Após confirmar a taxa de infectividade e o padrão de morte celular mediante a infecção pela cepa ZIKV PE243 de ZIKV, as BMDC foram cocultivadas na presença das linhagens SH-SY5Y infectadas e não infectadas com ZIKV PE243. As células SH-SY5Y foram infectadas utilizando o inóculo de MOI de 1 e Mock, por 48h, e então conjugadas com CFSE para caracterização da porcentagem de eferocitose por BMDC.

Não foi observada diferença na porcentagem de BMDC viáveis hábeis em fagocitar células na presença de Mock (Mock) ou células infectadas pelo ZIKV (ZIKV-iAC) (Fig. 9), ou seja, aproximadamente 30-40% de BMDC (CD11c) foram positivas para CFSE (CD11c+/CFSE+).

Além disso, a expressão de células CD11c, positivas pra CD86 e MHC-II, foi avaliada como parâmetro de ativação de BMDC. Essas moléculas passam a ser expressas em maior quantidade após a ativação e maturação de BMDC, as quais são essenciais durante o processo de ativação de linfócitos TCD4+. Quando avaliado o perfil de expressão dessas moléculas após o cocultivo com SH-SY5Y ZIKV-iAC, as BMDC apresentaram um aumento significativo na porcentagem de células CD11c+ viáveis expressando CD86 e MHC-II (Fig. 9 A), quando comparado à condição Mock, demonstrando ativação dessas BMDC. Além do aumento na porcentagem de células expressando essas moléculas, houve o aumento significativo da expressão pela MFI de CD86, 1,34 vez maior, e MHC-II, 1,51 vez maior, após a eferocitose de ZIKV-iAC compara a condição Mock (Fig.9 B e C).

A produção de citocinas é outro parâmetro importante para a avaliação da ativação das BMDC, tanto a concentração quanto o perfil dessas citocinas estão associados aos subtipos de linfócitos T CD4⁺. A eferocitose de SH-SY5Y ZIKV-iAC por BMDC resultou no aumento na produção de IL-1 β , IL-6 e TGF- β , quando comparado à condição Mock, indicando a ativação das BMDC e liberação de citocinas inflamatórias e anti-inflamatória. Não foi observada diferença na produção de IL-10 e TNF- α entre as condições.

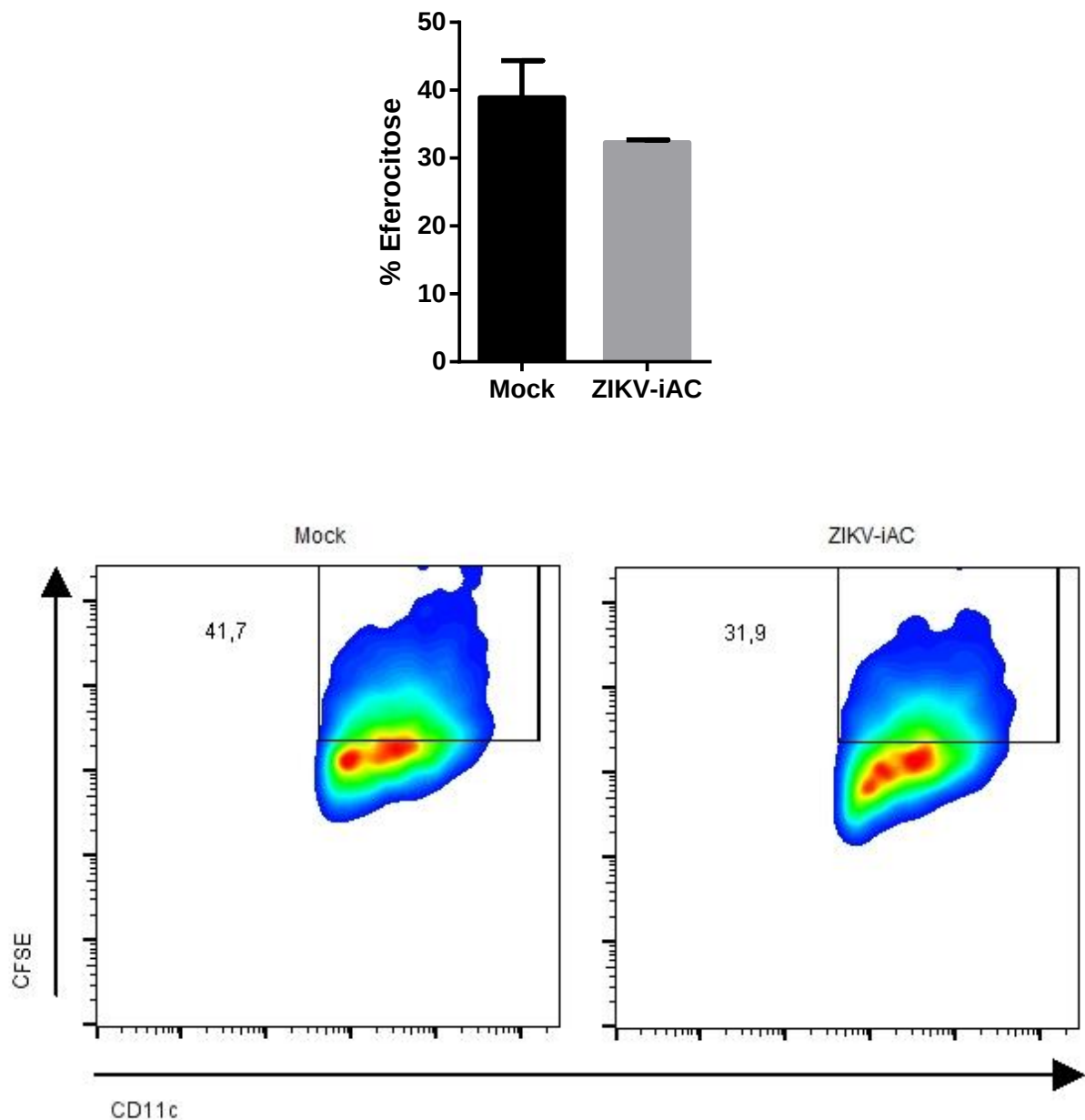


Figura 9. Células neurais infectadas com Zika não induzem aumento na taxa de eferocitose por BMDC. Após o cocultivo com (ZIKV-iAC) e (Mock), avaliamos a taxa de eferocitose das BMDC pela. A taxa de eferocitose é dada pela porcentagem de células CD11c+CFSE+ e representada em gráfico de densidade. Dados de um experimento em triplicata experimental.

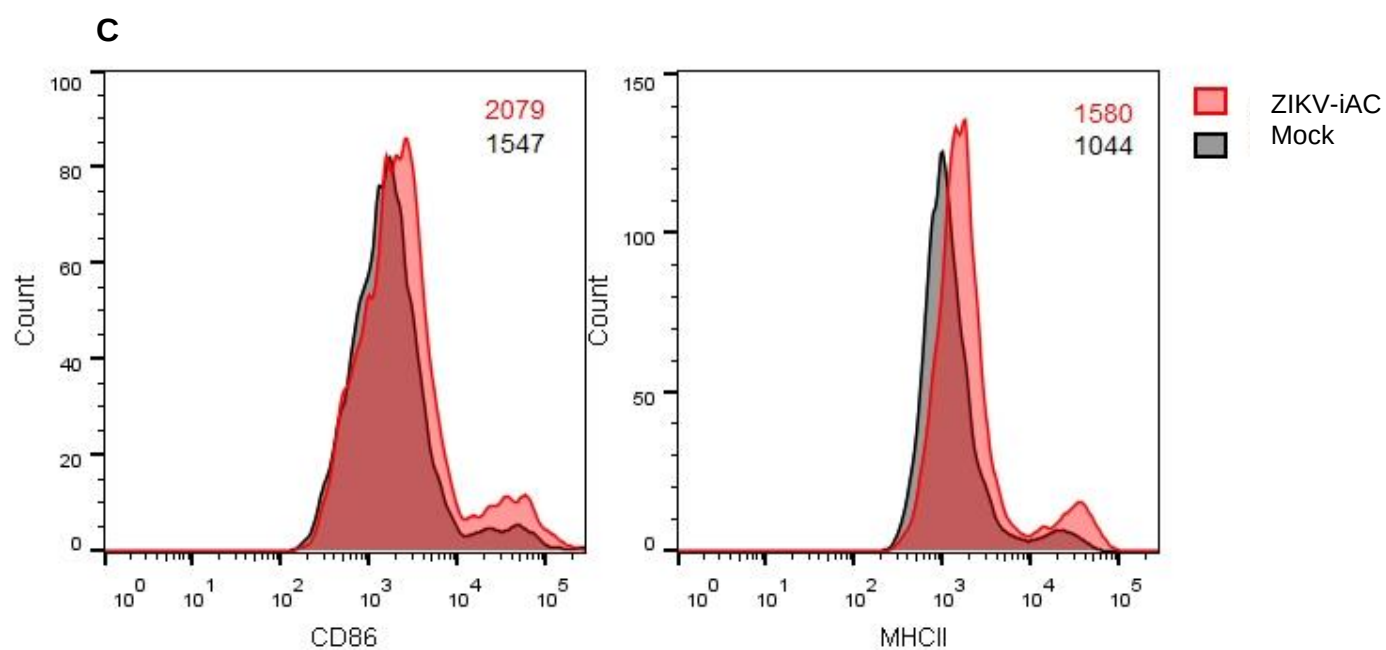
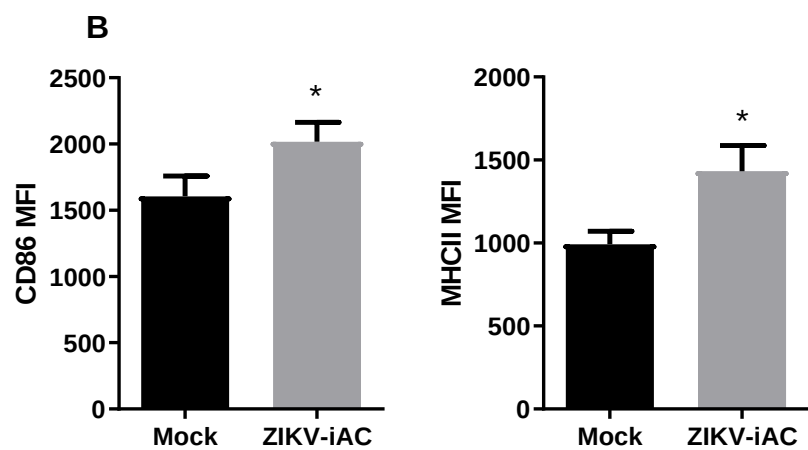
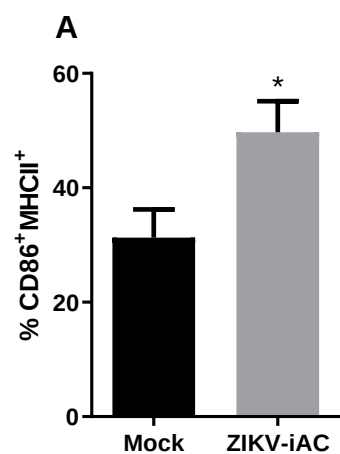


Figura 10. BMDC apresentam maior ativação após cocultivo com ZIKV-iAC. Após o cocultivo com ZIKV-iAC e Mock, avaliamos o perfil de ativação das BMDC pela expressão de MHCII e CD86. A porcentagem de células CD86+MHCII+ **(a)** é relativa as células CD11c pré-selecionada entre células viáveis. MFI das moléculas CD86 e MHCII de cada molécula **(b)** em histograma representativo **(c)**. Dados de um experimento em triplicata experimental.

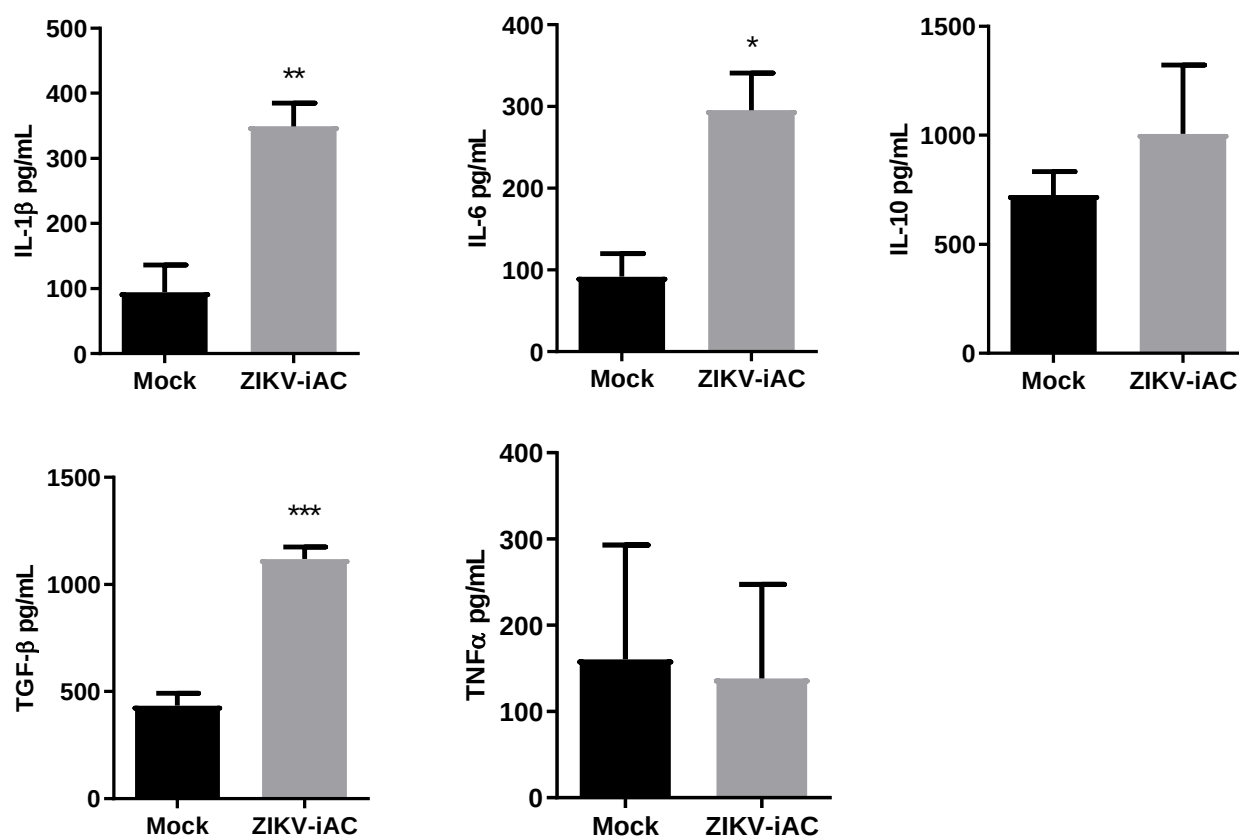


Figura 11. Eferocitose de SH-SY5Y ZIKV-iAC por BMDC tem maior produção de IL-1β, IL-6 e TGF-β. Células não infectadas (Mock) e infectadas (ZIKV-iAC) foram cocultivadas com BMDC e feita a quantificação das citocinas IL-1β, IL-6, IL-10, TGF-β e TNF-α do sobrenadante por ELISA. Dados de um experimento em triplicata experimental.

6. Discussão

O desenvolvimento de neuropatias em adultos associadas a infecção pelo ZIKV ainda não foi elucidado, tão pouco o impacto da eferocitose de células apoptóticas infectadas pelo vírus no desencadeamento dessas patologias. A hipótese desse estudo baseou-se que a infecção pelo ZIKV induz intensa morte celular por apoptose em diversos tipos celulares, incluindo células neuronais, e que o *clereance* dessas células por BMDC induz um perfil imunogênico associado a produção de citocinas inflamatórias capaz de ativar linfócitos T CD4+ autorreativos associados as neuropatias. A demonstração desse fenômeno explicaria como o ZIKV causa, por exemplo, a Síndrome de Guillain-Barré, abrindo possibilidades para estudos mais detalhados, incluindo formas de prevenção e tratamento das neuropatias.

O primeiro desafio deste trabalho foi definir uma linhagem celular como fonte de célula apoptótica infectada e padronizar a obtenção destas células. No início deste trabalho havia poucas publicações sobre a suscetibilidade de diferentes linhagens ao ZIKV e menos ainda sobre a cepa ZIKV PE243. Inicialmente, a linhagem celular HaCaT foi escolhida como possível fonte de ZIKV-iAC devido ao relato de que queratinócitos humanos são suscetíveis à infecção (34) e por serem a principal porta de entrada do vírus no organismo através da picada do inseto. Entretanto, ainda não há relatos da infectividade do ZIKV nesta linhagem e, diferente do que esperávamos inicialmente, a linhagem imortalizada mostrou-se resistente ao vírus e, portanto, com baixa taxa de infecção. A linhagem HaCaT possivelmente não expressa receptores necessários para a entrada do vírus, como por exemplo receptores da família TIM/TAM (32, 33), impedindo a infecção ou expressa fatores que impedem a replicação viral. Recentes estudos demonstram que outros tipos celulares também apresentam suscetibilidade a infecção pelo ZIKV, incluindo as linhagens A549, Huh7.5

e SH-SY5Y (46). Dessa forma, avaliamos a suscetibilidade dessas linhagens celulares, com adição da C6 proveniente de glioma de rato, frente as duas cepas de ZIKV MR766 e PE243, das linhagens africana e asiática, respectivamente. Dentre essas linhagens conseguimos reproduzir a alta taxa de infecção nas linhagens Huh7.5, hepatocarcinoma humano, e SH-SY5Y, neuroblastoma humano.

Após identificar a linhagem celular Huh7.5 como suscetível a infecção pelo ZIKV e, portanto, uma boa fonte de células apoptóticas, o ensaio de eferocitose foi realizado seguindo os parâmetros da infecção de 24 horas, utilizando MOI de 10. A irradiação UVC nesta linhagem aparentemente não foi capaz de induzir apoptose, uma vez que não foram observadas diferenças em relação a porcentagem de células apoptóticas fagocitadas (CD11c⁺CFSE⁺) entre os grupos irradiados e não irradiados. Além disso, as células Huh7.5 infectadas e irradiadas apresentaram uma tendência de redução na taxa de eferocitose, quando comparada as células não infectadas e irradiadas, indicando que a infecção pode induzir resistência dessas células à indução de apoptose. Essa diminuição ou resistência a indução a apoptose pode estar relacionada ao ciclo do vírus, no qual nas primeiras 24h após infecção ocorre uma ativação da família de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, impedindo que a célula se torne apoptótica para que partículas virais sejam produzidas e liberadas (47).

Em relação à produção de citocinas produzidas por BMDC durante o cocultivo de iACs foi observado uma tendência ao aumento das citocinas IL-10 e IL-6 nas condições de células Huh7.5 infectadas, algo ainda não relatado na literatura nessas condições, mas já descrito nas infecções pelo ZIKV diretamente em monócitos humanos (48). Por não ter sido observada uma diferença significativa quanto a produção dessas citocinas entre os cocultivos de ZIKV-iAC e Mock-UVC, acreditamos que o tempo de infecção de 24h utilizado para a linhagem Huh7.5 não tenha sido

suficiente para induzir alterações severas nas células infectadas para ativação de BMDC após a eferocitose. Ainda são necessárias replicatas experimentais com um tempo maior de infecção, provavelmente 48 h como foi observado posteriormente com a linhagem SH-SY5Y, para que possamos definir o perfil de ativação dessas BMDC.

Mediante aos resultados consistentes de suscetibilidade na linhagem neuronal SH-SY5Y pela cepa ZIKV PE243, foi feita a cinética dos níveis de apoptose após 24h, 48h e 72h de infecção com MOI 1. Diferente do que já foi demonstrado em estudos prévios na literatura (43), não foi observada uma diminuição na viabilidade celular após a infecção pelo ZIKV na linhagem SH-SY5Y a partir de 48h, quando avaliada em uma alta confluência celular na placa de 24 poços. Entretanto, quando realizamos a infecção utilizando a confluência adequada em um frasco de cultivo celular, nossos resultados confirmaram os obtidos previamente por Luplertlop e colaboradores (43), ou seja, foi possível observar a diminuição da viabilidade da linhagem SH-SY5Y infectada, quando comparada ao Mock.

Sabe-se que o reconhecimento de partículas virais, por exemplo material genético e proteínas, por PRR como TLR3, TLR7 e TLR8 pode resultar na ativação de fagócitos, como as células dendríticas(49-51). Nossos resultados demonstram que o cocultivo com células SH-SY5Y apoptóticas infectadas resultou na ativação de BMDC, resultando no aumento da expressão das moléculas CD86 e MHC-II, algo ainda não relatado na literatura, bem como a produção das citocinas IL-1 β e IL-6, quando comparado a condição Mock. Portanto, possivelmente a ativação de BMDC após a eferocitose de ZIKV-iAC ocorre pelos componentes virais ou padrões moleculares associados ao dano (DAMP) por PRR nos interior do fagolisossomo (52, 53). A maior produção de TGF- β na presença do ZIKV pode estar associada a maior porcentagem de células apoptóticas na condição infectada. A produção dessa

citocinas deve-se possivelmente ao reconhecimento de PS via receptores eferocíticos como *stabilin-2*, BAI-1, TIM-4 expressos por BMDC que resulta na produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , com o intuito suprimir a inflamação e manter a homeostasia (54), levando a ativação de células T reguladoras (11). Entretanto, na presença de IL-1 β e IL-6, juntamente com TGF- β , associado a uma maior ativação das BMDC, poderia levar a ativação de linfócitos T CD4⁺ naive no subtipo Th17 (55, 56), o qual é descrito por ter participação importantíssima em doenças autoimunes como esclerose múltipla, artrite reumatoide, psoríase e doenças inflamatórias intestinais (57, 58).

Em modelos experimentais de infecção, utilizando camundongos suscetíveis ao ZIKV, foi demonstrado o aumento de aproximadamente 4 vezes na população de células T CD4⁺ produtoras de IFN γ , indicando um predomínio do perfil de células Th1, e um aumento de 2 vezes nas células T CD4⁺ produtoras de IL-17, sugerindo também um perfil Th17 (59, 60). Acreditamos que não foi observado o perfil de citocinas para ativação de clones Th1 porque provavelmente é induzido pelo reconhecimento do ZIKV por outras células além das CD, como células NK e células epiteliais, crucias no reconhecimento e defesa contra diversos vírus (61).

Ao utilizar células dendríticas de camundongos foi possível excluir a detecção de citocinas provenientes das linhagens humanas e de uma possível infecção das BMDC pelo ZIKV presente no cocultivo, uma vez que essas células mostraram-se resistentes ao vírus, ao contrário das CD humanas (62, 63). Essas características suportam a hipótese do impacto da eferocitose de células infectadas na geração de um microambiente inflamatório, uma vez que somente após o processamento do conteúdo da célula apoptótica infectada pelo ZIKV houve a ativação e maior produção de citocinas. Vale ressaltar que a suscetibilidade da CD humana a cepa asiática pode

também ser decisiva para que ocorra uma maior ativação dessa célula e consequentemente a ativação de linfócitos T CD4⁺ autorreativos em humanos, sendo um importante ponto a ser avaliado também.

A linhagem SH-SY5Y mostrou-se de fácil manuseio, suscetível a infecção pelo ZIKV, sem necessidade de indução da apoptose por radiação UVC ou farmacológica (64) e corrobora com nossa hipótese de estudo por se tratar de uma célula neuronal. Os ensaios de cocultivo ainda necessitam de alguns controles como o uso de CD humanas e o bloqueio da eferocitose pelo uso de *microbeads* de Anexina-V e bloqueadores de receptores envolvidos na fagocitose de AC. Além disso, novos experimentos serão necessários para realização da cultura de linfócitos T CD4⁺ naive com o sobrenadante proveniente do cocultivo para avaliar a ativação de subtipos Th para confirmar a importância do perfil de citocinas produzido pelas BMDC.

7. Conclusões

- A suscetibilidade das linhagens Huh7.5 e SH-SY5Y a cepa PE243 possibilitou o uso dessas células na realização de experimentos como estes que foram propostos.
- A maior expressão de moléculas CD86 e MHCII em BMDC e a maior produção de citocinas IL-1 β , IL-6 e TGF- β após o cocultivo com células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV sugere que a presença do vírus é um fator diferencial para a modulação do perfil dessas BMDC.

8. Referências Bibliográficas

1. Elliott MR, Ravichandran KS. The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. *Developmental cell*. 2016;38(2):147-60.
2. Park JW, Ryter SW, Choi AM. Functional significance of apoptosis in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*. 2007;4(4):347-53.
3. Trahtenberg U, Mevorach D. Apoptotic Cells Induced Signaling for Immune Homeostasis in Macrophages and Dendritic Cells. *Front Immunol*. 2017;8:1356.
4. Hochreiter-Hufford AE, Lee CS, Kinchen JM, Sokolowski JD, Arandjelovic S, Call JA, et al. Phosphatidylserine receptor BAI1 and apoptotic cells as new promoters of myoblast fusion. *Nature*. 2013;497(7448):263-7.
5. Park SY, Jung MY, Kim HJ, Lee SJ, Kim SY, Lee BH, et al. Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ*. 2008;15(1):192-201.
6. He M, Kubo H, Morimoto K, Fujino N, Suzuki T, Takahashi T, et al. Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO reports*. 2011;12(4):358-64.
7. Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*. 2007;450(7168):435-9.
8. Kobayashi N, Karisola P, Pena-Cruz V, Dorfman DM, Jinushi M, Umetsu SE, et al. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity*. 2007;27(6):927-40.
9. Greenberg ME, Sun M, Zhang R, Febbraio M, Silverstein R, Hazen SL. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(12):2613-25.
10. Platt N, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(22):12456-60.
11. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalten JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*. 1997;390(6658):350-1.

12. Medeiros AI, Serezani CH, Lee SP, Peters-Golden M. Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE₂/EP₂ signaling. *J Exp Med*. 2009;206(1):61-8.
13. Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, et al. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *J Cell Biol*. 2011;195(6):931-42.
14. Watanabe Y, Shiratsuchi A, Shimizu K, Takizawa T, Nakanishi Y. Role of phosphatidylserine exposure and sugar chain desialylation at the surface of influenza virus-infected cells in efficient phagocytosis by macrophages. *J Biol Chem*. 2002;277(20):18222-8.
15. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, et al. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med*. 2003;9(8):1039-46.
16. Penteado LA, Dejana NN, Verdan FF, Orlando AB, Nino VE, Dias FN, et al. Distinctive role of efferocytosis in dendritic cell maturation and migration in sterile or infectious conditions. *Immunology*. 2017;151(3):304-13.
17. Elliott MR, Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol*. 2010;189(7):1059-70.
18. Blachere NE, Darnell RB, Albert ML. Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation. *PLoS Biol*. 2005;3(6):e185.
19. Subramanian M, Hayes CD, Thome JJ, Thorp E, Matsushima GK, Herz J, et al. An AXL/LRP-1/RANBP9 complex mediates DC efferocytosis and antigen cross-presentation in vivo. *J Clin Invest*. 2014;124(3):1296-308.
20. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 1998;392(6671):86-9.
21. Campisi L, Barbet G, Ding Y, Esplugues E, Flavell RA, Blander JM. Apoptosis in response to microbial infection induces autoreactive TH17 cells. *Nat Immunol*. 2016;17(9):1084-92.
22. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014;19(14).

23. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(2):359-61.
24. Miranda-Filho Dde B, Martelli CM, Ximenes RA, Araujo TV, Rocha MA, Ramos RC, et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. *Am J Public Health*. 2016;106(4):598-600.
25. Di Guardo G, Braga PB, Peron JP. Zika virus-associated brain damage: animal models and open issues. *Emerg Microbes Infect*. 2016;5(9):e106.
26. Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava JA, Chai G, Sheets N, Tang W, et al. Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):593-8.
27. Aid M, Abbink P, Larocca RA, Boyd M, Nityanandam R, Nanayakkara O, et al. Zika Virus Persistence in the Central Nervous System and Lymph Nodes of Rhesus Monkeys. *Cell*. 2017;169(4):610-20 e14.
28. Hirsch AJ, Smith JL, Haese NN, Broeckel RM, Parkins CJ, Kreklywich C, et al. Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. *PLoS Pathog*. 2017;13(3):e1006219.
29. Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, Qin Y, Patil VS, Eroshkin AM, et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*. 2016;19(2):258-65.
30. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*. 2016;18(5):587-90.
31. Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M, Kriegstein AR. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2016;18(5):591-6.
32. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep*. 2017;18(2):324-33.
33. Hastings AK, Hastings K, Uraki R, Hwang J, Gaitsch H, Dhaliwal K, et al. Loss of the TAM Receptor Axl Ameliorates Severe Zika Virus Pathogenesis and Reduces Apoptosis in Microglia. *iScience*. 2019;13:339-50.
34. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*. 2015;89(17):8880-96.

35. Jurado KA, Simoni MK, Tang Z, Uraki R, Hwang J, Householder S, et al. Zika virus productively infects primary human placenta-specific macrophages. *JCI insight*. 2016;1(13).
36. Carteaux G, Maquart M, Bedet A, Contou D, Brugieres P, Fourati S, et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *N Engl J Med*. 2016;374(16):1595-6.
37. Dos Santos T, Rodriguez A, Almiron M, Sanhueza A, Ramon P, de Oliveira WK, et al. Zika Virus and the Guillain-Barre Syndrome - Case Series from Seven Countries. *N Engl J Med*. 2016;375(16):1598-601.
38. Beckham JD, Pastula DM, Massey A, Tyler KL. Zika Virus as an Emerging Global Pathogen: Neurological Complications of Zika Virus. *JAMA Neurol*. 2016;73(7):875-9.
39. Swartwout BK, Zlotnick MG, Saver AE, McKenna CM, Bertke AS. Zika Virus Persistently and Productively Infects Primary Adult Sensory Neurons In Vitro. *Pathogens*. 2017;6(4).
40. Elong Ngono A, Vizcarra EA, Tang WW, Sheets N, Joo Y, Kim K, et al. Mapping and Role of the CD8(+) T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. *Cell Host Microbe*. 2017;21(1):35-46.
41. Pardy RD, Rajah MM, Condotta SA, Taylor NG, Sagan SM, Richer MJ. Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. *PLoS Pathog*. 2017;13(2):e1006184.
42. Roney K. Bone marrow-derived dendritic cells. *Methods Mol Biol*. 2013;1031:71-6.
43. Luplertlop N, Suwanmanee S, Muangkaew W, Ampawong S, Kitisin T, Poovorawan Y. The impact of Zika virus infection on human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. *J Vector Borne Dis*. 2017;54(3):207-14.
44. Liu J, Li Q, Li X, Qiu Z, Li A, Liang W, et al. Zika Virus Envelope Protein induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis via an Intrinsic Cell Death Signaling Pathway in Neuroendocrine PC12 Cells. *Int J Biol Sci*. 2018;14(9):1099-108.
45. Souza BS, Sampaio GL, Pereira CS, Campos GS, Sardi SI, Freitas LA, et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Sci Rep*. 2016;6:39775.
46. Chan JF, Yip CC, Tsang JO, Tee KM, Cai JP, Chik KK, et al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis,

non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg Microbes Infect.* 2016;5:e93.

47. Turpin J, Frumence E, Despres P, Viranaicken W, Krejbich-Trotot P. The ZIKA Virus Delays Cell Death Through the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins. *Cells.* 2019;8(11).

48. Foo SS, Chen W, Chan Y, Bowman JW, Chang LC, Choi Y, et al. Asian Zika virus strains target CD14(+) blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nat Microbiol.* 2017;2(11):1558-70.

49. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001;413(6857):732-8.

50. Ojha CR, Rodriguez M, Karuppan MKM, Lapierre J, Kashanchi F, El-Hage N. Toll-like receptor 3 regulates Zika virus infection and associated host inflammatory response in primary human astrocytes. *PLoS One.* 2019;14(2):e0208543.

51. Hornung V, Barchet W, Schlee M, Hartmann G. RNA recognition via TLR7 and TLR8. *Handb Exp Pharmacol.* 2008(183):71-86.

52. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(4):189-95.

53. Wang W, Li G, De W, Luo Z, Pan P, Tian M, et al. Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1beta secretion. *Nat Commun.* 2018;9(1):106.

54. Xiao YQ, Freire-de-Lima CG, Schiemann WP, Bratton DL, Vandivier RW, Henson PM. Transcriptional and translational regulation of TGF-beta production in response to apoptotic cells. *J Immunol.* 2008;181(5):3575-85.

55. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 2006;441(7090):231-4.

56. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24(2):179-89.

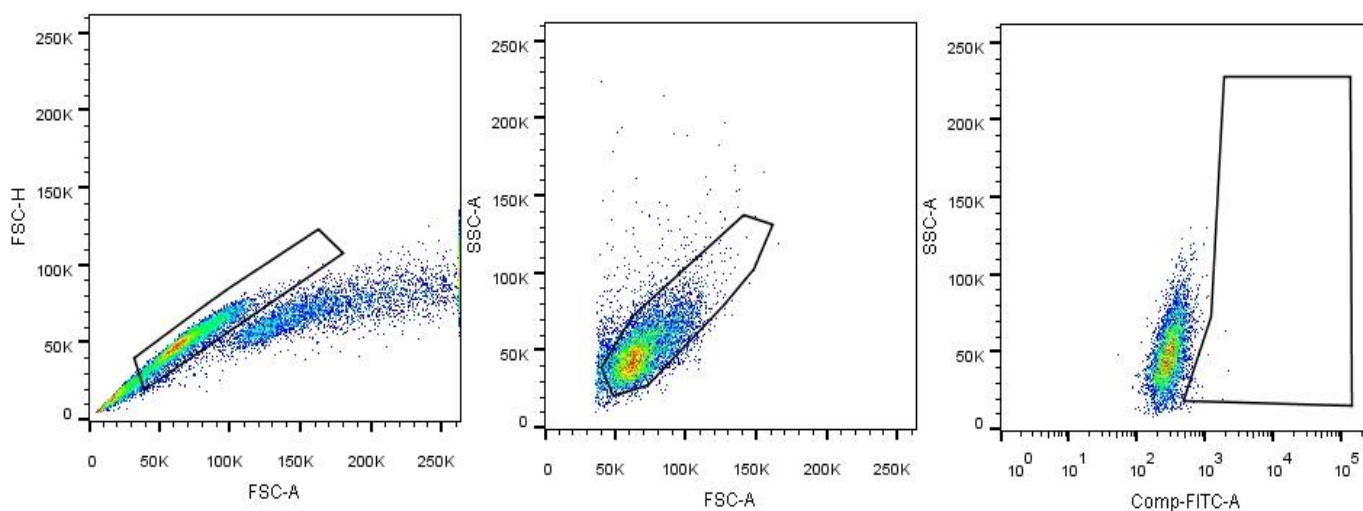
57. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 2002;8(5):500-8.

58. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(9):585-600.
59. Elong Ngono A, Young MP, Bunz M, Xu Z, Hattakam S, Vizcarra E, et al. CD4+ T cells promote humoral immunity and viral control during Zika virus infection. *PLoS Pathog.* 2019;15(1):e1007474.
60. Lucas CGO, Kitoko JZ, Ferreira FM, Suzart VG, Papa MP, Coelho SVA, et al. Critical role of CD4(+) T cells and IFNgamma signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. *Nat Commun.* 2018;9(1):3136.
61. Braciale TJ, Hahn YS. Immunity to viruses. *Immunol Rev.* 2013;255(1):5-12.
62. Sun X, Hua S, Chen HR, Ouyang Z, Einkauf K, Tse S, et al. Transcriptional Changes during Naturally Acquired Zika Virus Infection Render Dendritic Cells Highly Conducive to Viral Replication. *Cell Rep.* 2017;21(12):3471-82.
63. Vielle NJ, Zumkehr B, Garcia-Nicolas O, Blank F, Stojanov M, Musso D, et al. Silent infection of human dendritic cells by African and Asian strains of Zika virus. *Sci Rep.* 2018;8(1):5440.
64. Morris EJ, Geller HM. Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *J Cell Biol.* 1996;134(3):757-70.

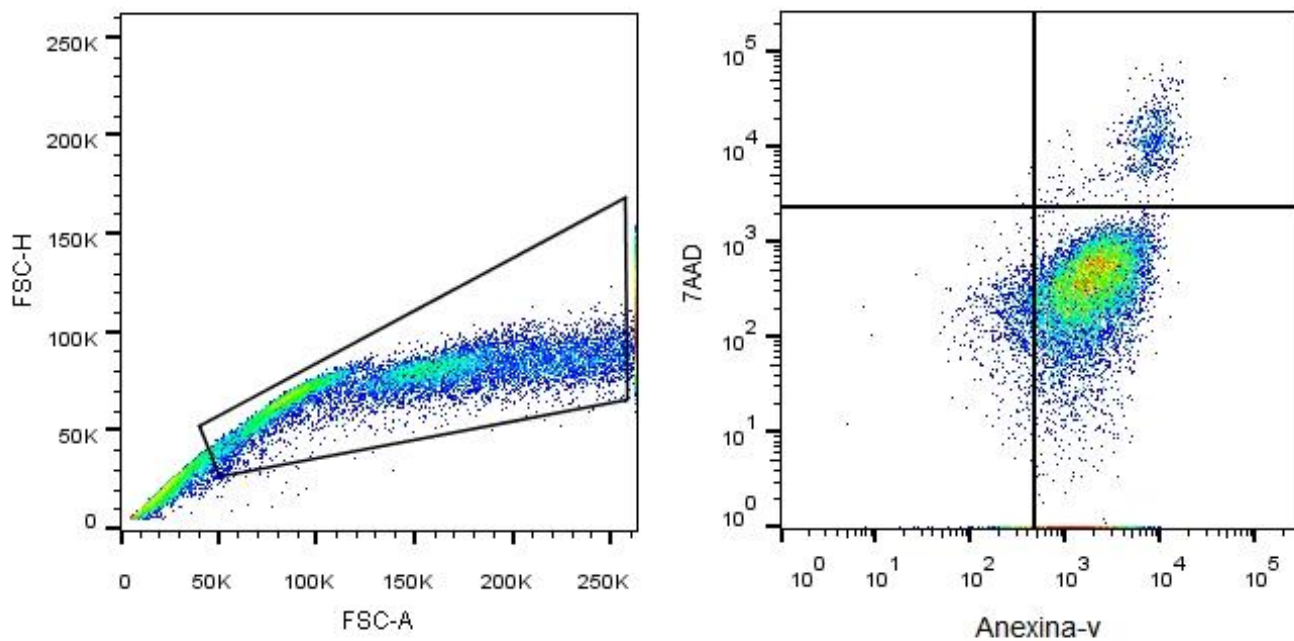
Anexos

Anexo A. Estratégias de “gating”

Para a aquisição de eventos na citometria de fluxo foram utilizadas estratégias de *gating* para cada experimento. Para avaliar a taxa de infecção dos diferentes tipos celulares foram feitas as exclusões de *debris* e *doublets* e definida a população positiva para FITC⁺ a partir da condição Mock. No caso da avaliação da taxa de infecção das BMDC foi feito a mesma estratégia com a exclusão de células CD11c negativas.



Para a avaliação da taxa de apoptose celular foram excluídos *debris* somente, uma vez que todo conteúdo celular das condições seria utilizado nos experimentos de cocultivo.



A avaliação da taxa de fagocitose e de ativação de BMDC foram adquiridas utilizando a estratégia de eliminação de *doublets* e *debris*, eliminação de células positivas para *Fixable Viability Stain 780* e de células CD11c negativas, com o intuito de selecionar BMDC viáveis.

