UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

BRENO VILAS BOAS RAIMUNDO

Impacto da eferocitose de células infectadas pelo Zika vírus na ativação de células dendríticas e diferenciação de clones de linfócitos T autorreativos

ARARAQUARA/SP
2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

BRENO VILAS BOAS RAIMUNDO

Impacto da eferocitose de células infectadas pelo Zika vírus na ativação de células dendríticas e diferenciação de clones de linfócitos T autorreativos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração: Imunologia, Curso de Doutorado.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

ARARAQUARA/SP
2024

Raimundo, Breno Vilas Boas.
R153i Impacto da eferocitose de células infectadas pelo Zika vírus na ativação de células dendríticas e diferenciação de clones de linfócitos T autorreativos / Breno Vilas Boas Raimundo. – Araraquara, 2024.
89 f. : il.

Tese (Doutorado) – 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: Imunologia.

Orientadora: Alexandra Ivo de Medeiros.

1. Apoptose. 2. Eferocitose. 3. Zika vírus. 4. Células dendríticas. 5. Autorreatividade. 6. Linfócitos T CD4+. I. Medeiros, Alexandra Ivo de, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Impacto da eferocitose de células infectadas pelo Zika vírus na ativação de células dendríticas e diferenciação de clones de linfócitos T autorreativos

AUTOR: BRENO VILAS BOAS RAIMUNDO
ORIENTADORA: ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área de conhecimento: Imunologia pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. VÂNIA LUIZA DEPERON BONATO (Participaçao Virtual)
Departamento de Bioquímica e Imunologia / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. JULIANO BORDIGNON (Participaçao Virtual)
Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz)

Profa. Dra. ALESSANDRA D'ALMEIDA FILARDY (Participaçao Virtual)
Departamento de Imunologia / Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Araraquara, 29 de julho de 2024

Essa tese recebeu fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo, 2021/02506-5; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 140732/2020-9. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço à Secretaria Técnica de Pós-graduação da FCFAr/Araraquara-SP pelo apoio.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP de Araraquara.

Dedico esta tese aos meus pais, com gratidão eterna e amor profundo.

Vocês, que me deram a vida, foram a luz que guiou cada passo do meu caminho. Suas palavras de incentivo e seus gestos de apoio moldaram o alicerce sobre o qual construí meus sonhos.

A herança mais preciosa que vocês me deixaram não é de ouro ou prata, mas sim o inestimável tesouro do conhecimento. Este é o legado que brilha com uma luz que nunca se apaga, que cresce e floresce, multiplicando-se a cada nova descoberta e a cada lição aprendida.

Obrigado por me ensinarem que o saber é a chave que abre todas as portas e por me inspirarem a buscar sempre mais. Esta conquista é tão minha quanto é de vocês, pois sem o seu amor, apoio e sabedoria, ela jamais seria possível.

Agradecimentos

Às orientadoras,

Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros
Profa. Dra. Naiara Naiana Dejani

Às mentoras,

Dra. Leticia de Aquino Penteado
Me. Ludmilla da Silva Pereira

Aos alunos de iniciação científica,

Gabriel Ferranti Corrêa
Victor Hugo Nascimento

Aos colegas de laboratório,

Profa. Dra. Tatiana Maria
Me. Karen Cristina Oliveira
Fernanda Ragonese
Ana Luiza Magoço
Rainá Honório
Lívia Kaori

Às técnicas do Departamento de Ciências Biológicas,

Dra. Caroline Marcos
Dra. Mariana Gouvêa

À secretária do Departamento de Ciências Biológicas,

Queila Simone Baraldo Leme

À colaboradora,

Profa. Dra. Pryscilla Wowk

Agradecimentos especiais

Nina ∞
Me. Paulo Fernando Carlstrom
Dra. Thaiany Goulart

Agradecimentos eternos

À minha família

RESUMO

Prévios estudos demonstram que infecções virais, podem desencadear doenças autoimunes mediante a quebra da tolerância imunológica e ativação de células TCD4+ autorreativas. A infecção por Zika vírus (ZIKV) pode causar uma intensa resposta imune levando a morte de células neuronais resultando em neuropatologias, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB). Estudos têm demonstrado que a eferocitose de células apoptóticas infectadas (iAC) por células dendríticas (DCs) pode desempenhar um papel importante tanto na resolução da infecção, como no desenvolvimento de clones autorreativos. Portanto, nesse estudo, nós hipotetizamos que a infecção por ZIKV resulta na morte celular, e a eferocitose dessas células apoptóticas infectadas poderia induzir a ativação de DCs e de células T $CD4^+$ autorreativas. Incialmente estabelecemos a infecção de ZIKV em uma linhagem celular de neuroblastoma, SH-SY5Y. A taxa de infecção obtida após 48h de infecção em MOI de 1 foi de aproximadamente 35% de células positivas para o anticorpo anti-4G2. Diferente do esperado, a infecção não alterou significativamente a porcentagem de apoptose, no entanto, após radiação com UV-C (5mJ) obtivemos ~30% das células positivas para caspase 3-clivada. A eferocitose de células apoptóticas contendo uma baixa taxa de infecção ($^{Low\ rate}$ ZIKV-iAC, ~ 27%) não resultou em diferenças significativas na expressão de marcadores de ativação celular, como CD86, MHC-II e PD-L1 em DCs, quando comparado as condições DC+AC ou DC+Meio. Confirmando o perfil tolerogênico dessas células, a eferocitose de $^{Low\ rate}$ ZIKV-iAC não foi capaz de induzir a proliferação e ativação de clones autorreativos, como demonstrado pelos ensaios utilizando linfócitos de animais OT-II. Na tentativa de avaliar se a taxa de infeção poderia influenciar o perfil de ativação de DCs durante a eferocitose, realizamos o isolamento apenas das células apoptóticas infectadas com ZIKV, por *sorting*, resultando em um enriquecimento de ~86% de infectadas com ZIKV ($^{High\ rate}$ ZIKV-iAC, ~86%). A eferocitose dessas células contento uma alta taxa de infecção parece quebrar o perfil tolerogênico dessas DCs, mediante ao aumento da expressão de MHC-II e CD86, e a diminuição de PDL-1 em DCs. Além disso, apenas a eferocitose de $^{High\ rate}$ ZIKV-iAC foi hábil aumentar a expressão de *Ifn1*, *Ifn2*, e *Stat1*, quando comparado às condições BMDC, BMDC+AC ou BMDC+$^{Low\ rate}$ ZIKV-iAC. A diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ na presença de meio condicionado (CM) oriundo de DCs cultivadas na presença de $^{high\ rate}$ ZIKV-iAC, sugere um perfil de diferenciação em Th17. Portanto, a taxa de infecção parece ser determinante para a que a eferocitose possa impactar na maturação de BMDCs e na ativação de linfócitos T $CD4^+$, o que poderia favorecer a imunidade contra o patógeno, bem como o desenvolvimento de clones autorreativos.

Palavras-chave: Apoptose; Eferocitose; Zika Vírus; Células Dendríticas; Autorreatividade; Linfócitos T $CD4^+$.

ABSTRACT

Previous studies have shown that viral infections can trigger autoimmune diseases through the breakdown of immune tolerance and the activation of autoreactive CD4+ T cells. Zika virus (ZIKV) infection can elicit a strong immune response, leading to neuronal cell death and resulting in neuropathologies, such as Guillain-Barré syndrome (GBS). Studies have demonstrated that the efferocytosis of infected apoptotic cells (iAC) by dendritic cells (DCs) may play a significant role both in resolving the infection and in the development of autoreactive clones. Therefore, in this study, we hypothesized that ZIKV infection results in cell death, and the efferocytosis of these infected apoptotic cells could induce the activation of DCs and autoreactive CD4+ T cells. Initially, we established ZIKV infection in a neuroblastoma cell line, SH-SY5Y. The infection rate obtained after 48 hours of infection at an MOI of 1 was approximately 35% of cells positive for the anti-4G2 antibody. Contrary to expectations, the infection did not significantly alter the percentage of apoptosis; however, after UV-C irradiation (5mJ), we observed 30% of cells positive for cleaved caspase-3. The efferocytosis of apoptotic cells with a low infection rate (Low rate ZIKV-iAC, 35% iACs) did not result in significant differences in the expression of cellular activation markers, such as CD86, MHC-II, and PD-L1 in DCs, when compared to the DC+AC or DC+Medium conditions. Confirming the tolerogenic profile of these cells, the efferocytosis of Low rate ZIKV-iAC was not able to induce the proliferation and activation of autoreactive clones, as demonstrated by assays using lymphocytes from OT-II mice. In an attempt to assess whether the infection rate could influence the activation profile of DCs during efferocytosis, we isolated only the ZIKV-infected apoptotic cells through sorting, resulting in an enrichment of ~86% ZIKV-infected cells (High rate ZIKV-iAC, ~86%). The efferocytosis of these cells with a high infection rate appears to disrupt the tolerogenic profile of these DCs, as evidenced by the increased expression of MHC-II and CD86, and the decreased expression of PDL-1 in DCs. Furthermore, only the efferocytosis of High rate ZIKV-iAC was capable of upregulating the expression of Ifn1, Ifn2, and Stat1, compared to the BMDC, BMDC+AC, or BMDC+Low rate ZIKV-iAC conditions. The differentiation of CD4+ T lymphocytes in the presence of conditioned medium (CM) from DCs cultured with high rate ZIKV-iAC suggests a Th17 differentiation profile. Therefore, the infection rate appears to be a determinant for efferocytosis to impact BMDC maturation and CD4+ T lymphocyte activation, which could favor immunity against the pathogen, as well the development of autoreactive T cells.

Keywords: Apoptosis; Efferocytosis; Zika Virus; Dendritic Cells; Self-Reactivity. CD4+ T Lymphocytes.

Lista de Figuras

Figura 1. Eferocitose.....23
Figura 2. Hipótese do Estudo.....30
Figura 3. Taxa de infecção e indução de apoptose de células da linhagem neuronal SH-SY5Y.....42
Figura 4. Taxa de apoptose após a infecção por ZIKV 43
Figura 5. Taxa de apoptose após a indução por UV-C 44
Figura 6. BMDCs são capazes de eferocitar células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV. .45
Figura 7. Fenótipo de BMDCs após eferocitose de células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV. 47
Figura 8. Fenótipo de MoDCs após a eferocitose de células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV. 48
Figura 9. Produção de citocinas por DCs após a eferocitose de células AC ou ZIKV-iAC.....49
Figura 10. Produção de citocinas por MoDCs após a eferocitose de células AC ou ZIKV-iAC.....49
Figura 11. Perfil de diferenciação de linfócitos T CD4+ naive cultivados na presença de Meio condicionado (MC) oriundo da eferocitose de ZIKV-iAC. 51
Figura 12. Incorporação de ovoalbumina (OVA) em células apoptótica infectadas ou não com ZIKV.....53
Figura 13. Ensaio de proliferação e ativação de linfócitos T OT-II cocultivados com DC+ZIKV-iAC. 56
Figura 14. Protocolo experimental para seleção de células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV por Sorting.....58
Figura 15. Fenótipo de BMDCs após eferocitose de células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV e isoladas por sorting.....60
Figura 16. Perfil de citocinas produzido por BMDCs durante a eferocitose de $^{high\ rate}$ ZIKV-iAC e $^{low\ rate}$ ZIKV-iAC. Células apoptóticas não infectadas (AC) e infectadas isoladas ($^{high\ rate}$ ZIKV-iAC) ou não isoladas ($^{low\ rate}$ ZIKV-iAC) por cell sorting. 61
Figura 17. Expressão de genes associados expressão de genes regulados por IRF3/7 e NF-kB.....62
Figura 18. Perfil de diferenciação de linfócitos T CD4+ cultivados na presença de Meio condicionado (CM) oriundo da eferocitose de $^{high\ rate}$ ZIKV-iAC. 63

Lista de abreviaturas

AC - Células Apoptóticas (Mock)

BMDCs - Células Dendríticas Derivadas de Precursores da Medula Óssea

$CD4^+$ - Linfócitos T $CD4^+$

$CD8^+$ - Linfócitos T $CD8^+$

Cyto D - Citocalisina D

DCs - Células Dendríticas

DD - *domain of death*

DENV - Vírus da dengue

DRs - *death receptors*

Gas6 - Proteína ligadora do receptor Axl

G-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

iAC - Células Apoptóticas Infectadas por ZIKV

IFNAR - Receptor de Interferon

IFN-γ - Interferon Gama

IKKe: Proteína Quinase IκB

IRF - Fator Regulador Interferon

IRF3/7/9 - Fatores reguladores interferon 3 e 7

ISGF3 - Fator 3 do Gene Estimulado por Interferon

ISGs - Genes Estimulados por Interferon

ISRE - Elemento de Resposta Estimulado por Interferon

IVIg - Imunoglobulina Humana Intravenosa

JEV - Vírus da encefalite japonesa

LCE - Líquido Cérebro-Espinhal

MFI – Intensidade da Mediana de Fluorescência

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

Mock - Controle Negativo

MOI - Multiplicidade de Infecção

NF-kB - Fator de Transcrição Nuclear kappa B

OVA - Ovoalbumina

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PE243: Cepa do Zika vírus isolado no Estado de Pernambuco, Brasil

PKH26 - Corante de Marcação Celular

PKH67 - Corante de Marcação Celular

PRRs - Receptores de Reconhecimento de Padrões

PS - Fosfatidilserina

RIG-I - Receptor de reconhecimento de RNA viral

sfRNAs - RNAs subgenômicos de flavivírus

SGB - Síndrome de Guillain-Barré

SNC - Sistema Nervoso Central

STAT - Fator de Transcrição e Ativador de Sinal

TAM - Família de receptores Tyro3, Axl e Mer

TIM - Família de receptores de fosfatidilserina

TLRs - Receptores do Tipo Toll

UV-C: Radiação ultravioleta C

WNV - Vírus do Nilo Ocidental

ZIKV – Zika vírus

Sumário

1. INTRODUÇÃO 16
1.1. Zika vírus 16
1.3. Apoptose celular 19
1.4. Apoptose de células infectadas por ZIKV 20
1.5. Fagocitose de células apoptóticas - Eferocitose 21
1.6. Eferocitose na relação Patógeno-Hospedeiro 24
1.7. Síndrome de *Guillain-Barré* por ZIKV (ZIKV-SGB) 26
2. JUSTIFICATIVA 29
3. HIPÓTESE DE ESTUDO 30
4. OBJETIVOS 31
4.1. Objetivo geral 31
4.2. Objetivos específicos 31
5. METODOLOGIA 32
5.1. Cultivo celular 32
5.2. Cultivo Viral 32
5.3. Titulação dos estoques virais 32
5.4. Ensaio de infecção de ZIKV SH-SY5Y 33
5.5. Padronização e avaliação da taxa de apoptose 34
5.6. Separação de células infectadas e apoptóticas por *Sorting* 34
5.7. Diferenciação de células dendríticas derivadas de precursores da medula óssea (BMDC) 34
5.8. Ensaio de eferocitose 35
5.9. Quantificação de citocinas 35
5.10. Isolamento de células T $CD4^+$ *naive* e ensaio de diferenciação de linfócitos T 36
5.11. Avaliação da diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ por citometria de fluxo 36
5.12. Incorporação de ovoalbumina (OVA) por choque osmótico 37
5.13. Ensaios proliferação de linfócitos T $CD4^+$ OT-II 37
5.14. Análise da expressão de alvos gênicos por qPCR 38
5.15. Avaliação da ativação de células dendríticas derivadas de monócitos humanos (MoDCs) após a eferocitose de ZIKV-iAC 39
5.16. Quantificação de citocinas produzidas pelas MoDCs 39

5.17. Análise estatística 40

6. RESULTADO 41

6.1. Padronização da infecção e indução de apoptose nas células da linhagem SH-SY5Y infectadas com ZIKV 41

6.2. ..... Avaliação da capacidade fagocítica de AC e ZIKA-iAC por BMDCs 44

6.3. Determinação do fenótipo de BMDC (DCs) e de MoDC e produção de citocinas após a eferocitose de células apoptóticas infectadas por ZIKV (ZIKA-iAC) 45

6.4. Diferenciação de células T CD4^{+} na presença de meio condicionado (CM) oriundo da co-cultura de BMDCs e ZIKV-iAC. 50

6.5. Incorporação de Ovoalbumina-FITC por células apoptóticas submetidas a choque osmótico 52

6.6. Avaliação da proliferação e ativação de linfócitos T CD4^{+} OT-II mediante a co-cultura de DC após eferocitose de ZIKV-iAC-OVA e AC-OVA 53

6.7. Enriquecimento da população de ZIKV-iAC e o impacto da eferocitose contendo alta taxa de ZIKV em células apoptóticas infectadas ($^{high\ rate}$ ZIKV-iAC) 57

6.8. Eferocitose de $^{high\ rate}$ ZIKV-iAC aumenta a expressão de genes regulados por IRF3/7 e NF-kB 62

6.9. Perfil de diferenciação dos subtipos de células T CD4^{+} na presença do CM oriundo da co-cultura de BMDCs+ $^{high\ rate}$ ZIKV-iAC 62

7. DISCUSSÃO 64

8. CONCLUSÕES 72

9. CONCLUSÃO FINAL 74

10. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) 75

ANEXO A - ESTRATÉGIA DE "*GATING*" 88

1. INTRODUÇÃO

1.1. Zika vírus

O Zika vírus (ZIKV) pertence à família Flaviviridae, que também inclui o vírus da encefalite japonesa (JEV) e o vírus da dengue (DENV) (J. K. Lee; Shin, 2019). O ZIKV é um vírus de RNA de fita simples com sentido positivo. Seu genoma codifica uma única poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais: o capsídeo (C), o precursor de membrana (prM) e as proteínas do envelope (E), além de sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), responsáveis pela replicação e montagem viral (Dai *et al.,*2016; Shankar *et al.,*2017). A proteína E desempenha um papel fundamental na interação do vírus aos receptores celulares, dentre estes destacam-se os de Lectina do tipo C (CLRs), os receptores da família TIM (TIM1, TIM3 e TIM4) e TAM (Tyro3, Axl e Mer) (Hamel *et al.,*2015; Shi; Gao, 2017).

A proteína NS1 é um biomarcador no diagnóstico de flavivírus e interage com células do sistema imune contribuindo para a evasão e a patogênese viral (KYUNG *et al.,*2006; SHI; GAO, 2017). Por meio da proteína NS1, o ZIKV é capaz de inibir a produção de interferon (IFN), uma importante citocina para o estabelecimento do estado antiviral (Coldbeck-Shackley *et al.,*2020). Outros estudos demonstram que a proteína NS1 interage com a deubiquitinase USP8 do hospedeiro facilitando a desubiquitinação da caspase-1, que cliva proteoliticamente o cGAS, reduzindo a produção de IFN na célula (Zheng *et al.,*2018). A proteína NS5 é altamente conservada e desempenha um papel crucial na replicação viral, sendo dependente do domínio RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), enquanto o domínio metiltransferase (MTase) está envolvido no mecanismo de evasão da resposta imune (Shi; Gao, 2017).

As proteínas não estruturais atuam na formação de uma rede membranosa em conjunto com o retículo endoplasmático (RE). Os vírions imaturos são reunidos dentro do RE, onde o RNA viral é complexado com a proteína C e envolto por uma bicamada lipídica contendo heterodímeros das proteínas prM e E. Por meio da rede trans-Golgi, as vesículas contendo os vírions são transportadas e sofrem modificações importantes, como a glicosilação e a clivagem da proteína

prM em M. Após esses processos, os vírions infecciosos são secretados da célula por exocitose (Fernandez-Garcia *et al.,*2009; Valadão *et al.,*2016).

O ZIKV pode infectar diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais, epiteliais, mononucleares de sangue periférico, astrócitos e micróglias (Hou *et al.,*2017), tendo como as células progenitoras de neurônios humanos, as principais células-alvo (Miner*;* Diamond, 2017). Estudos demonstraram sua capacidade de replicação em várias células da placenta, como trofoblastos, vilosidades coriônicas e células epiteliais amnióticas (Aagaard *et al.,*2017; Retallack *et al.,*2016). In vitro, foi comprovado que o vírus pode infectar células da pele humana, como fibroblastos e queratinócitos (J. C. Chen *et al.,*2016). Além disso, células mieloides humanas, como células dendríticas (DCs) e macrófagos, também são permissivas a infecção por ZIKV.

1.2. Resposta imunológica e mecanismo de evasão ZIKV

A resposta imunológica à infecção viral pode ser dividida em três fases: (1) reconhecimento da partícula viral por componentes do sistema imune inato; (2) produção de intermediários da cascata de interferons (IFNs); e (3) desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Annie Elong Ngono; Shresta., 2018; Meylan *et al.,*2006; Miner*;* Diamond, 2017; Serman; Gack, 2019). O ZIKV possui mecanismos de evasão da resposta imunológica, tais como, estratégias de mascaramento do RNA genômico livre no citosol e inibição da ativação da cascata de sinalização via IFNs, etapa importante como sinal de alerta para a infecção (Estévez-Herrera *et al.,*2021).

Após a infecção, diversas cascatas de sinalização são desencadeadas no interior da célula. Um processo importante de proteção é o estabelecimento da resposta antiviral que consiste na presença dos fatores reguladores de IFNs, que passam a ser expressos após a infecção, e o genoma viral de RNA de fita simples positiva é reconhecido pelos receptores *Toll-like* 3 e/ou TLR-7/8 no interior da vesícula endossomal (Ojha *et al.,*2019; Vanwalscappel; *et al.,*2018). A infecção viral pode ativar as proteínas quinases TBK1 e IKKε, que fosforilam os fatores de transcrição IRF3/7, enquanto a proteína quinase IKKε ativa o fator de transcrição NF-kB. Isso resulta na expressão de IFN-β do tipo I e na síntese de genes antivirais e pró-inflamatórios (Bowen; *et al.,*2019; Mcnab *et al.,*2020).

O IFN do tipo I é produzido em resposta ao reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Honda*;* Taniguchi, 2006; O. Takeuchi*;* Akira, 2007). Os IFNs do tipo I ligam-se ao receptor IFNAR e estimulam a transcrição de genes induzidos por IFN, o que estabelece um estado antiviral e restringe a replicação do vírus (Sadler*;* Williams, 2008; Schoggins*;* Rice, 2011). O IFN desempenha um papel importante na ativação da resposta imune adaptativa, indução da apoptose e contribui para a patogênese viral (Chawla-Sarkar *et al.,*2003; Crouse *et al.,*2015). Para uma replicação viral eficiente, é necessário neutralizar as respostas antivirais do IFN tipo I. Proteínas virais como a proteína E e NS, além do RNA genômico e viral, são capazes de inibir as vias de sinalização de IFN (Estévez-Herrera *et al.,*2021). A interação de ZIKV na célula do hospedeiro via Axl, mediante a interação da proteína ponte Gas6, inibe a sinalização do IFN tipo I favorecendo a supressão precoce da resposta imunológica durante a infecção viral (LEMKE, 2013; MEERTENS *et al.,*2017, RETALLACK *et al.,*2016).

As proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) do ZIKV também desempenham importante funções na modulação de células da imunidade inata, alterando as cascatas de sinalização de interferons (IFNs). A proteína NS1 interfere na via cGAS-STING associada ao IFN, facilitando a clivagem de cGAS e reduzindo a sinalização de IFN tipo I em monócitos da linhagem THP-1 (Zheng *et al.,*2018). *In vivo* foi demonstrado que a NS2A atua no gene promotor de IFN-β, regulando negativamente sua expressão, por meio da supressão dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) RIG-I e MDA5 (Meylan *et al.,*2006). NS2B promove a replicação do vírus e inibe a apoptose através da interação com o receptor RIG-I em células epiteliais da linhagem 293T (Y. Wu *et al.,*2017). A proteína NS3 também interfere na via de sinalização via RIG-I e MDA5, bem como nas proteínas adaptadoras 14-3-3, favorecendo a replicação viral em astrócitos humanos imortalizados (Riedl *et al.,*2019). NS4A inibe a expressão de genes que codificam IFN-β e IRF3, suprimindo a resposta de IFN tipo I (Kumar *et al.,*2016). NS4B inibe a atividade de TBK1 em células da linhagem 293T (oligomerização e fosforilação), que é responsável pela ativação do IFN (Y. Wu *et al.,*2017). A proteína NS5 inibe a sinalização de IRF3 e NF-kB, evitando a ativação de uma resposta protetora. Além disso, NS5 se liga ao

domínio semelhante a ubiquitina de TBK1, impedindo sua interação com o receptor TRAF6, interferindo assim na transcrição de IFN tipo I e III (Lin; *et al.,*2019). Uma pesquisa recente descobriu que o gene estimulado por interferon 15 (ISG15) tem a capacidade de estabilizar a protease USP18, evitando assim a degradação do STAT2 provocada pela proteína NS5, o que leva a uma resposta eficaz na contenção do ZIKV (Espada *et al.,*2024).

Os RNAs subgenômicos de flavivírus (sfRNAs) do ZIKV inibem a produção de IFN através das vias RIG-I e MDA-5, embora o mecanismo exato ainda não seja totalmente elucidado (Donald *et al.,*2016). Estudos demonstraram que sfRNAs podem estar envolvidos na infecção por ZIKV e na neuro-patogenicidade, e esses eventos foram associados à ausência de IFN (Lazear *et al.,*2016; J. K. Lee*;* Shin, 2019; Smith *et al.,*2017; Tripathi *et al.,*2017).

1.3. Apoptose celular

A apoptose é um processo natural de regulação celular que envolve a eliminação de células senescentes, danificadas ou infectadas por patógenos. Alguns dos sinais clássicos da apoptose incluem alterações morfológicas e enzimáticas. Essas modificações são importantes para a identificação e eliminação eficiente das células após a morte celular (D'Arcy, 2019). Existem duas vias principais envolvidas no processo de apoptose: a via intrínseca (ou mitocondrial) e a via extrínseca (envolvendo perforina, granzima e receptores de morte celular) (Sadri Nahand *et al.,*2021).

A via intrínseca é regulada por uma série de sinais intracelulares mitocondriais, incluindo fatores de crescimento, hormônios e citocinas. Nessa via, as proteínas da família Bcl-2 desempenham um papel crucial. Essas proteínas podem ser pró-apoptóticas (como Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bcl-10, Bik e Blk) ou anti-apoptóticas (como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-x, Bcl-XS, Bcl-w e BAG). As proteínas da família Bcl-2 estão envolvidas na regulação da permeabilidade da membrana mitocondrial, levando à perda do potencial de membrana mitocondrial e à liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (Ashkenazi*;* Salvesen, 2014; Kilbride*;* Prehn, 2013; Pan *et al.,*2021; W. W. L. Wong*;* Puthalakath, 2008).

A via extrínseca envolve receptores de morte DRs (*death receptors*) presentes na membrana celular. Esses receptores fazem parte da superfamília do

fator de necrose tumoral (TNF) (Locksley *et al.,*2001). Quando sinais extracelulares de morte celular se ligam aos receptores, ocorre a ativação de proteínas citoplasmáticas que possuem um domínio de morte DD (*domain of death*) e que se ligam aos DRs (Suliman *et al.,*2001). Alguns dos ligantes dos DRs incluem DR3, Apo2L; DR4, Apo2L; DR5; FasL; Fas; TNF-α; TNFR1, Apo3L. A ativação dos DRs desencadeia uma cascata de ativações bioquímicas que culminam na ativação das caspases. Quando as caspases 8-10 estão ativas, ocorrem reações enzimáticas que podem hidrolisar a caspase 3/6/7, induzindo a apoptose (Ashkenazi, 2008; Pan *et al.,*2021). A via extrínseca também pode se conectar à via intrínseca, pois a ativação da caspase-8 pode clivar a proteína Bid, ativando assim a via de apoptose mediada pela mitocôndria (K. Huang *et al.,*2016).

1.4. Apoptose de células infectadas por ZIKV

O ZIKV tem tropismo por células do sistema nervoso central. À medida que ocorre a replicação viral foi demonstrado que células progenitoras neurais e organoides derivados de células-tronco pluripotentes entram em processo de morte celular (Devhare *et al.,*2017; Souza *et al.,*2016; Tang *et al.,*2017). Estudos realizados por Martinot et al. (2019) demonstram que macacos do gênero *Rhesus* infectados com ZIKV no início da gravidez apresentaram morte celular por apoptose de células neuroprogenitoras (Martinot *et al.,*2019). Prévios estudos demonstram que linhagens de células neurais *in vitro* entram em apoptose após a infecção por ZIKV, mediante a ativação das caspases 3/7, 8 e 9 tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CHEN *et al.,*2017; HUANG *et al.,*2016; LEE *et al.,*2020, EL GHOUZZI *et al.,*2016; SOUZA *et al.,*2016). A infecção por ZIKV em células renais de camundongos, neuroprogenitoras de macacos *Rhesus* e em células-tronco neurais humanas (hNSCs), induz a ativação da apoptose por diminuição da expressão de Bcl-2 e aumento da expressão de caspase-3 (PAN *et al.,*2021).Outra via relacionada a apoptose induzida por ZIKV é mediada pela proteína p53 (proteína supressora de tumor) que leva a ativação de genes que codificam proteínas pró-apoptóticas, como Bax, Noxa e Puma, que inibem a expressão gênica de survivina (proteína anti-apoptótica), resultando na morte celular por apoptose (PAN *et al.,*2021). Devhare et al. demonstraram que a

infecção por ZIKV em células progenitoras neurais humanas leva ao aumento nos níveis de p21 e Puma (proteínas pró-apoptóticas envolvidas na via intrínseca) (Pan *et al.,*2021; Teng *et al.,*2017). Além disso, a proteína ZIKV-C (presente no capsídeo viral) interage com o homólogo da proteína MDM2, que está envolvida na via de apoptose mediada por p53, levando à morte células neurais infectadas (Pan *et al.,*2021; Teng *et al.,*2017). Ainda, um conjunto de proteínas virais, como ZIKV-M e ZIKV-E, podem induzir a parada do ciclo celular na fase G2/M e apoptose (Slomnicki *et al.,*2017). Han et al. (2021) demonstraram que a proteína NS4B do ZIKV pode recrutar Bax para a mitocôndria, ativando-o e causando apoptose. Portanto, esses estudos demonstram que ZIKV é capaz de induzir intensa morte celular, utilizando diferentes vias de sinalização e modulação da expressão gênica diretamente relacionada a um padrão de morte celular por apoptose.

1.5. Fagocitose de células apoptóticas - Eferocitose

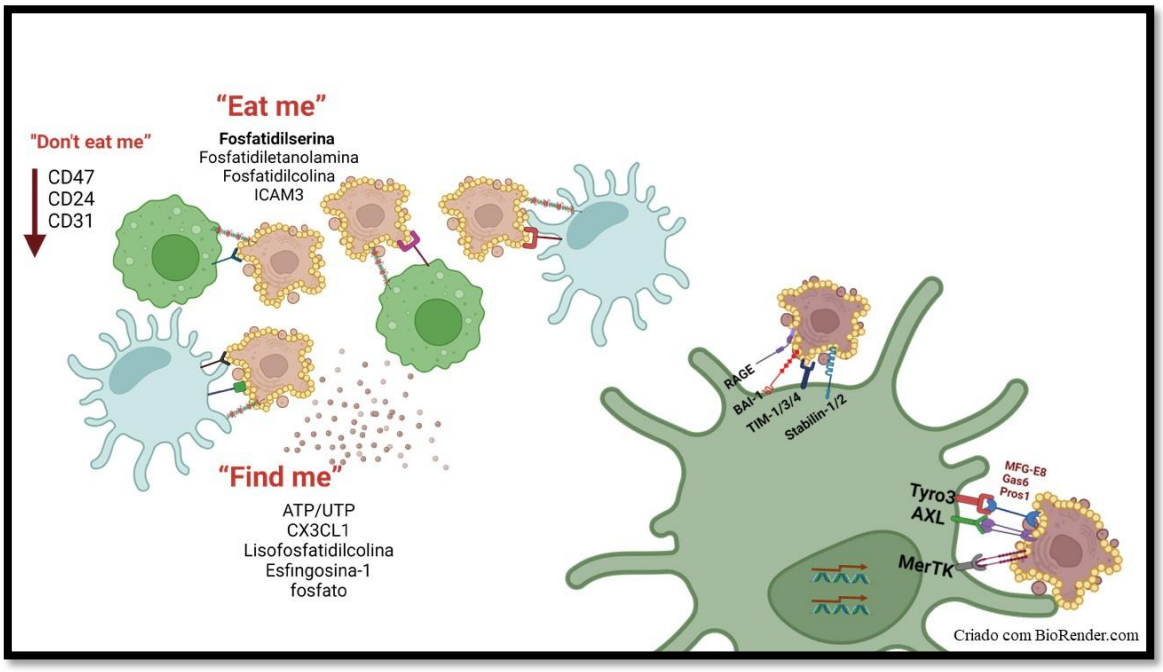
O corpo humano adulto é composto aproximadamente por 37,2 trilhões de células, e cerca de 0,4% dessas células entram em apoptose por dia (Bianconi *et al.,*2013). A remoção eficiente dessas células apoptóticas (ACs) ocorre primordialmente por células fagocíticas profissionais, como macrófagos e células dendríticas (DCs), e não profissionais, como células epiteliais, processo esse denominado eferocitose (McIntosh, 2017; Morioka; *et al.,*2019).

As DCs foram descritas por Ralph Steinman e Zanvil Cohn em 1973 (RALPH M. STEINMAN; ZANVIL A. COHN., 1973), e possuem a notável capacidade de fagocitar, processar e apresentar antígenos via das moléculas de histocompatibilidade I (MHC-I) e II (MHC-II), e essas células podem ser classificadas em diferentes subtipos, dependendo de seu fenótipo, localização ou função (Tewfik Miloud; *et al.,*2010). As DCs convencionais (cDCs) atuam na ativação das células T e são encontradas nos órgãos linfoides secundários e nos tecidos periféricos. Nesse contexto, as células dendríticas convencionais podem ser classificadas como células dendríticas convencionais do tipo 1 (cDC1s) ou células dendríticas convencionais do tipo 2 (cDC2s) (Cabeza-Cabrerizo *et al.,*2021). A cDC1 é caracterizada por alta expressão de CD8α (uma proteína crucial para distinguir a cDC1 de outros tipos de DCs) e Flt3, um receptor de

tirosina quinase (Mayer *et al.,*2014). Em humanos, a presença das proteínas CD205, CD207, CD103, XCR1 e CLEC9A tem sido utilizada como marcadores para cDC1s (Cabeza-Cabrerizo *et al.,*2021; Mayer *et al.,*2014). Por outro lado, as cDC2s apresentam baixa expressão de CD8α e expressão das proteínas CD4 e CD36 (Receptor *Scavenger* B2) (Tewfik Miloud; *et al.,*2010). Em humanos, a presença da proteína CD5 tem sido utilizado como marcador para cDC2 (Merad *et al.,*2013). A cDC1 é um subtipo importante na ativação de linfócitos T $CD8^+$, desempenhando um papel fundamental nas respostas a patógenos intracelulares. Em contraste, a cDC2 está mais relacionada à ativação dos linfócitos T $CD4^+$ estando envolvidas nas respostas a patógenos extracelulares, bem como na resposta imune humoral (Tewfik Miloud; *et al.,*2010).

A eferocitose de corpos apoptóticos por DCs desempenha um papel chave na regulação da resposta imune e na manutenção da homeostase no organismo. Esses fagócitos são capazes de reconhecer e fagocitar células apoptóticas, participando ativamente da remoção eficiente dessas células. Durante o processo de apoptose celular sinais de "*find-me*" são liberados favorecendo a quimioatração de células fagocíticas (Boada-Romero; *et al.,*2020). Esses mediadores podem ser diversos, como lipídios de membrana (lisofosfatidilcolina - LPC, esfingosina-1-fosfato - S1P), nucleotídeos (ATP e UTO) e quimiocinas (CX3CL1) (Elliott *et al.,*2009; Lauber *et al.,*2003; Truman *et al.,*2008). Os mediadores solúveis liberados direcionam os fagócitos ao encontro das células apoptóticas e preparam as células fagocíticas para o engolfamento, aumentando a expressão dos receptores eferocíticos, modulando o citoesqueleto e ativando a maquinaria de digestão celular (Medina *et al.,*2020; Medina*;* Ravichandran, 2016).

Figura 1. Eferocitose.



Durante o processo de apoptose celular sinais de "*find-me*" são liberados favorecendo a quimioatração de células fagocíticas. Esses mediadores podem ser diversos, como lipídios de membrana (lisofosfatidilcolina - LPC, esfingosina-1-fosfato - S1P), nucleotídeos (ATP e UTO) e quimiocinas (CX3CL1). Os mediadores solúveis liberados direcionam os fagócitos ao encontro das células apoptóticas e preparam as células fagocíticas para o engolfamento, aumentando a expressão dos receptores eferocíticos, modulando o citoesqueleto e ativando a maquinaria de digestão. Os sinais de "*eat-me*", bem como a supressão dos sinais de "*don't eat-me*" (CD47 e CD24), expresso em células saudáveis, são imprescindíveis para a fagocitose dos corpos apoptóticos. Em células viáveis, a fosfatidilserina (PS) permanece no folheto interno da bicamada lipídica da membrana plasmática. O reconhecimento da fosfatidilserina envolve a interação com diversos receptores como a mucina-1 dos linfócitos T (TIM1) e TIM4, o inibidor da angiogênese específico do cérebro 1 (BAI1), estabilina-2 e membros da família CD300. Algumas proteínas de ligação solúveis podem atuar de forma indireta nos receptores de fagócitos, como as integrinas (MFG-E8) e as proteínas S e GAS6 nos receptores da família TAM (Tyro3, Axl e MerTk). Fonte: Autor

Além do sinal de *"find-me"*, a interação e o reconhecimento de células apoptóticas por fagócitos, ou sinais de "*eat-me*", bem como a supressão dos sinais de *"don't eat-me"* (CD47 e CD24), expresso em células saudáveis, são imprescindíveis para a fagocitose dos corpos apoptóticos. Em células viáveis, a fosfatidilserina (PS) permanece no folheto interno da bicamada lipídica da membrana plasmática (Boada-Romero; *et al.,*2020). A PS é mantida no folheto interno de forma regulada e dependente das enzimas flippases e scramblases (Fujii *et al.,*2015; Segawa*;* Nagata, 2015; J. Suzuki *et al.,*2014). Durante o início do processo de apoptose, a caspase-3 cliva e inativa as flippases e ativa as scramblases, gerando uma desestabilização da PS, levando a sua expressão no folheto externo da membrana plasmática (J. Suzuki *et al.,*2013). O reconhecimento da fosfatidilserina envolve a interação com diversos receptores

como a mucina-1 dos linfócitos T (TIM1) e TIM4, o inibidor da angiogênese específico do cérebro 1 (BAI1), estabilina-2 e membros da família CD300 (Doran *et al.,*2021; H. N. Lee *et al.,*2017). Algumas proteínas de ligação solúveis podem atuar de forma indireta nos receptores de fagócitos, como as integrinas (MFG-E8) e as proteínas S e GAS6 nos receptores da família TAM (Tyro3, Axl e MerTk) (Geng *et al.,*2017; Guimarães-Pinto *et al.,*2024).

Em 2016 foi elucidado um mecanismo de ativação de clones de células $TCD4^+$ autorreativas a partir da apresentação de autoantígenos por células dendríticas, no contexto de remoção de células apoptóticas infectadas por *Citrobacter rodentium* (Campisi *et al.,*2016).

1.6. Eferocitose na relação Patógeno-Hospedeiro

A eferocitose desempenha um papel essencial na ativação de células dendríticas e macrófagos, e indiretamente na ativação de linfócitos T, durante a resposta imune do hospedeiro contra o agente infeccioso (Martin *et al.,*2014; Tufail *et al.,*2017). Durante o processo infeccioso, a interação do patógeno ou de seus componentes com as células do microambiente induz a liberação de citocinas e quimiocinas, que promovem o recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção, como neutrófilos. Esses neutrófilos, uma vez no local da infecção, fagocitam o microrganismo e após horas a poucos dias morrem por diferentes padrões de morte celular, como por exemplo, apoptose celular (Torchinsky *et al.,*2009a).

Essas células apoptóticas infectadas, contendo PAMPs no seu interior (Brereton; Blander, 2011a), são prontamente fagocitadas por células especializadas, como DCs e macrófagos. Neste contexto, após maturação, as DCs têm a capacidade de migrar para os linfonodos e induzir a diferenciação de linfócitos Th1/Th17 (Niño-Castaño *et al.,*2022a; Torchinsky *et al.,*2009a). Nossos e outros grupo de pesquisa demonstraram que BMDCs após a eferocitose de células apoptóticas e infectadas por *Escherichia coli* estabelecem um microambiente com maior produção de interleucina-1β (IL-1β), interleucina-6 (IL-6) e prostaglandina E_2 (PGE_2) em comparação com a eferocitose de células apoptóticas não infectadas (AC), sendo estas citocinas importantes para a diferenciação de linfócitos Th17 (Dejani *et al.,*2018; Nicole *et al.,*2016; Penteado

*et al.,*2017). Ninõ-Castaño *et al.,*2022 demonstrou que BMDCs após a eferocitose de neutrófilos de Ratos *Wistar* apoptóticos e infectadas por *Streptococcus pneumoniae* estabelecem um microambiente com maior produção de IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α em comparação com a eferocitose de AC. Além disso, células T $CD4^+$ cultivadas na presença de meio condicionado, oriundo do sobrenadante da co-cultura de BMDCs-*Sp*-iAC (*S. pneumoniae*) leva a diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ *naive* em linfócitos Th1 (Niño-Castaño *et al.,*2022a). Portanto, o tipo de patógeno parece ser determinante no estabelecimento do microambiente de citocinas após a eferocitose de células apoptóticas infectadas por DCs, o que influencia diretamente no perfil de ativação de células T $CD4^+$.

Prévios estudos demonstram, que a eferocitose de células apoptóticas infectadas por DCs são capazes de apresentar aos linfócitos T CD4, via MHC-II, tanto peptídeos derivados do patógeno quanto peptídeos próprios provenientes das células apoptóticas (Albert *et al.,*1998; Campisi *et al.,*2016). Neste contexto, um elegante estudo utilizando animais transgênicos que expressam ovoalbumina (OVA) nas células, demonstrou, que a transferência de células $TCD4^+$ de animais OT-II, em animais infectados com *C. rodentium*, resulta na ativação de clones autorreativos. Além disso, foi também demonstrado que 60% dos animais desenvolveram colite autoimune, sendo detectado IgA contra OVA (Campisi *et al.,*2016). Quando a apoptose das células foram inibidas utilizando o inibidor de pan-caspase, houve uma significativa redução no número células Th17 comparado com os animais infectados na ausência do inibir de apoptose (Campisi *et al.,*2016). Campisi et al. demonstrou que a eferocitose de iACs (*C. rodentium)* promove a apresentação de antígenos próprios e esse fenômeno quando associado ao microambiente inflamatório e com pré-disposições genéticas do hospedeiro podem desencadear ativação de células T autorreativas e o desenvolvimento de autoimunidades.

Embora vários estudos tenham abordado a capacidade do ZIKV de induzir a morte em diferentes tipos celulares (Anfasa *et al.,*2019; Frumence *et al.,*2016), até o momento não há relatos relacionados sobre o impacto da eferocitose de células infectadas pelo ZIKV na ativação das DCs, tanto pouco sobre a eliminação ou disseminação do vírus. Estudos anteriores revelaram que a fagocitose de células infectadas pelo vírus Herpes Simplex 1 por DCs resulta em um aumento

da expressão de moléculas de MHC, possibilitando a apresentação cruzada e contribuindo para o controle da replicação viral, através da ativação de linfócitos T $CD8^+$ (Blachère *et al.,*2005; Subramanian *et al.,*2014). No entanto, ainda existem questões a serem desvendadas: *i) o papel da fagocitose de células apoptóticas infectadas pelo ZIKV na disseminação ou eliminação viral permanece incerto; ii) se a apresentação de peptídeos endógenos derivados dos componentes celulares apoptóticos, em um contexto inflamatório, poderia promover a ativação de clones autorreativos e o desenvolvimento de neuropatias.*

1.7. Síndrome de *Guillain-Barré* por ZIKV (ZIKV-SGB)

A síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma polirradiculoneuropatia imunomediada, associada a um diagnóstico clínico de fraqueza crescente, rápida e progressiva podendo atingir os membros, músculos cranianos e respiratórios (Papri *et al.,*2021). Dados epidemiológicos e sorológicos demonstram que as epidemias de ZIKV estão relacionadas ao aumento no número de pacientes com SGB (Cao-Lormeau *et al.,*2016). Pacientes com ZIKV-SGB apresentam rápido desenvolvimento clínico, com graves sintomas neurológicos. A SGB em pacientes infectados por ZIKV normalmente é diagnosticada entre 5-10 dias, diferente da forma clássica quando os pacientes são diagnosticados entre 2-4 semanas (Willison *et al.,*2016).

A possível conexão entre ZIKV e a Síndrome de Guillain-Barré tem despertado grande interesse entre médicos e epidemiologistas, principalmente devido às dificuldades no diagnóstico preciso da infecção (MUÑOZ; PARRA; PARDO, 2017). A detecção do ZIKV é geralmente realizada por meio da análise do RNA viral usando a técnica de RT-qPCR, em amostras de sangue, sendo mais efetiva entre o terceiro e o quinto dia após a infecção. Posteriormente, quando a carga viral diminui, a presença de anticorpos específicos é usada como método diagnóstico (Lanciotti *et al.,*2008). É importante destacar que o sistema nervoso central (SNC) dos fetos é particularmente suscetível aos efeitos neurodegenerativos do ZIKV em comparação aos adultos (KLASE *et al.,*2016; MUÑOZ; PARRA; PARDO, 2017). Uma das hipóteses que tenta explicar a neuro patogênese do ZIKV é a possibilidade de anticorpos pré-existentes contra outros flavivírus apresentarem atividade cruzada, intensificando assim a gravidade da

infecção por meio de um aumento dependente desses anticorpos. Os anticorpos do tipo IgG produzidos contra as proteínas E e prM do ZIKV, ao invés de neutralizarem o vírus, formam imunocomplexos de vírus-anticorpo que são endocitados por células que expressam receptores FcRγ, resultando no aumento do número de células infectadas (MUÑOZ; PARRA; PARDO, 2017). Outra hipótese relacionada ao desenvolvimento da SGB e ZIKV sugere que anticorpos anti-ZIKV possam atacar antígenos presentes no sistema nervoso periférico, desencadeando um processo de mimetismo molecular, o qual resultaria em uma forte resposta inflamatória mediada por células, ativação de macrófagos e apoptose (Oh *et al.,*2017). Mediante aos prévios estudos que relatam à ativação de clones autorreativos durante a remoção dessas células infectadas em no modelo de infecção intestinal bacteriana, o acúmulo de células apoptóticas infectadas com ZIKV no SNC poderia também contribuir no aumento na incidência de SGB durante o processo de remoção desses corpos apoptóticos por DCs.

Subpopulações de linfócitos Th1 e Th17 têm sido descritas em várias doenças neuropáticas relacionadas a infecções virais anteriores. Em pacientes infectados pelo ZIKV durante a fase aguda, tem sido observado um aumento nos níveis de citocinas no soro, associado a diferentes subpopulações de linfócitos Th1, Th2, Th9 e Th17 (Tappe *et al.,*2016a). Em um estudo de caso, foram identificados níveis elevados de IL-6, IL-8, IL-1ra e G-CSF, além da presença do RNA do ZIKV no líquido cérebro-espinhal de um paciente com lesão neuronal grave, que pode explicar a tetraparesia e a insuficiência respiratória associadas à encefalomielite. A detecção da presença do ZIKV e de citocinas inflamatórias no líquido cérebro-espinhal (LCE) indica a ativação de células do sistema imunológico, incluindo micróglia, e o recrutamento de outras células imunes para o local da infecção, o que pode desempenhar um papel na lesão neuronal (Galliez *et al.,*2016).

Durante a infecção por ZIKV, vários sintomas clínicos parecem estar associados à presença do vírus no cérebro, como neurodegeneração no cerebelo e um aumento significativo de linfócitos T $CD4^+$ no tecido cerebral (Manangeeswaran *et al.,*2016). A elevação das populações de linfócitos T $CD8^+$ e $CD4^+$ sugere o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa específica contra o ZIKV (Han *et al.,*2014; X. Wu *et al.,*2016). Pacientes diagnosticados com

SGB apresentam níveis aumentados de citocinas IL-17 e IL-22 no sangue, além da presença de subpopulações de células Th1, Th17 e Th22 circulantes em casos de SGB, encefalites ou meningites de origem viral. A presença de células Th22 está fortemente correlacionada com a gravidade da doença em portadores de SGB. O tratamento com Imunoglobulina Humana Intravenosa (IVIg) demonstrou regular negativamente essas células e as citocinas IL-17 e IL-22, resultando em melhorias clínicas nos pacientes. Isso sugere que as células Th17 e Th22 podem desempenhar um papel na iniciação e desenvolvimento da SGB (Li *et al.,*2014).

Embora tenham sido relatados casos anteriores de colite autoimune em modelos experimentais associados à ativação de clones de linfócitos T $CD4^+$ autorreativos e à eferocitose de células apoptóticas infectadas com *C. rodentium*, ainda não se sabe se a eferocitose de células apoptóticas infectadas pelo ZIKV pode contribuir para a ativação e maturação de células dendríticas, resultando na diferenciação de linfócitos Th1 e Th17 autorreativos*. Nesse trabalho tentamos contribuir no entendimento de uma possível ativação de clones T CD4 autorreativos, por DCs, durante o processo de remoção de corpos apoptóticos infectados com ZIKV.*

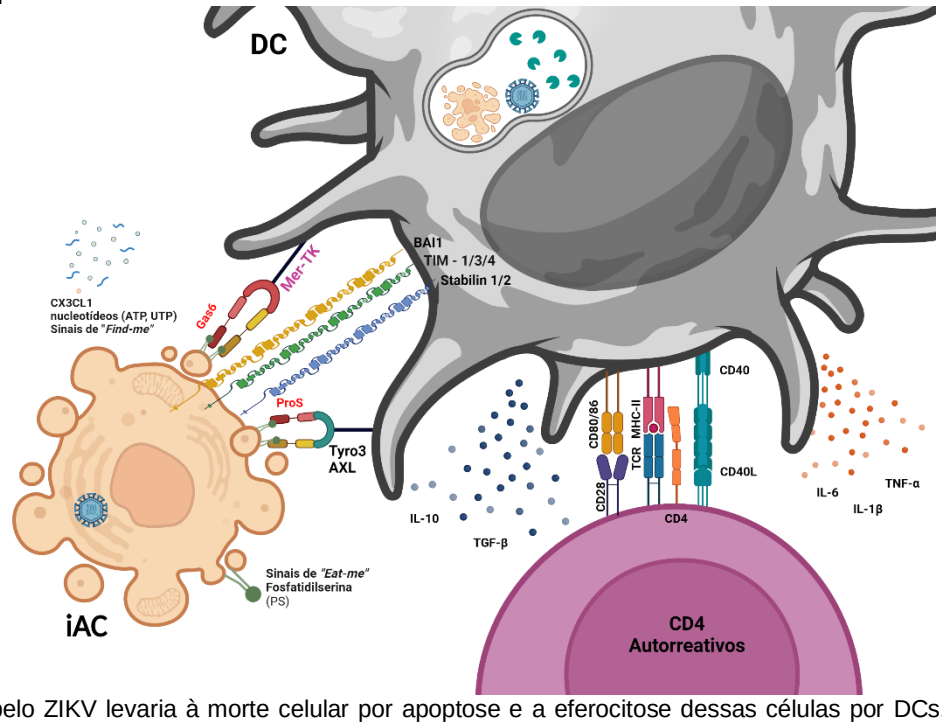
2. JUSTIFICATIVA

As células progenitoras neurais têm uma alta suscetibilidade à infecção pelo ZIKV, o que resulta na inibição da sua proliferação e na morte celular por apoptose. Estudos prévios demonstram a detecção de níveis elevados de citocinas inflamatórias no líquido cefalorraquidiano, juntamente com uma carga viral significativa, e uma correlação positiva com distúrbios neurológicos graves. É conhecido que a remoção rápida e eficiente de células apoptóticas desempenha um papel crucial na preservação do tecido e na manutenção da homeostase, devido a produção de mediadores anti-inflamatórios e diferenciação de linfócitos T regulatórios (Treg). No entanto, durante um processo infeccioso, a remoção de células apoptóticas infectadas resulta na produção de mediadores inflamatórios, devido ativação de TLR, favorecendo a formação de um microambiente propício para a diferenciação de linfócitos Th1/Th17. A presença dessas subpopulações de linfócitos é fundamental para a resolução da infecção. Estudos anteriores também demonstraram que a eferocitose de células apoptóticas infectadas por bactérias pode promover a ativação e maturação de células dendríticas, criando um ambiente propício para a ativação de clones de linfócitos T $CD4^+$ autorreativos, devido à apresentação de peptídeos próprios derivados das células apoptóticas infectadas.

3. HIPÓTESE DE ESTUDO

A infecção por ZIKV induz a apoptose de células neuronais em modelos experimentais *in vivo*, bem como em cultura de organoide cerebral. Além disso, foi observado a presença de altos níveis de citocinas inflamatórias e RT-qPCR positivo para ZIKV no líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes distúrbios neurológicos graves. No entanto, até o momento nada se sabe sobre uma possível correlação da eferocitose de células infectadas pelo ZIKV resultando na maturação de DCs e desencadeamento de uma doença autoimune mediada por linfócitos T CD4$^+$ autorreativos. *Dessa forma, esse estudo fundamenta-se na hipótese que a eferocitose de células apoptóticas infectadas com ZIKV por DCs levaria ao aumento da apresentação de peptídeos virais, bem como de peptídeos próprios oriundos do corpo apoptótico. A apresentação desses peptídeos próprios em moléculas de MHC, associada ao aumento na expressão de moléculas coestimuladoras e à produção de citocinas inflamatórias, poderia desencadear a ativação de clones de linfócitos T CD4$^+$ autorreativos.*

Figura 2. Hipótese do Estudo.



A infecção pelo ZIKV levaria à morte celular por apoptose e a eferocitose dessas células por DCs, o que promoveria a expressão de moléculas de MHC de classe II e moléculas coestimuladoras, como CD80 e CD86, além da secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Essa ativação de DCs após a eferocitose poderia facilitar a ativação de linfócitos T CD4$^+$ durante a infecção e favorecer o desenvolvimento de respostas imunes específicas, levando a eliminação e controle da replicação viral ou até mesmo a ativação de linfócitos T autorreativos. Desta forma, a hipótese deste projeto é que a eferocitose de células infectadas pelo ZIKV promoveria a ativação de DCs, aumentando a expressão de moléculas de MHC, de coestímulo e produção de citocinas inflamatórias e, dessa maneira, favorecendo a apresentação de peptídeos próprios e a ativação de clones de linfócitos T CD4$^+$ autorreativos. Fonte: Autor

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar se a eferocitose de células infectadas por ZIKV é capaz de promover a ativação de células dendríticas imunogênicas e de clones de linfócitos T $CD4^+$ autorreativos.

4.2. Objetivos específicos

i. Padronizar a infecção de células da linhagem SH-SY5Y (neuroblastoma) por ZIKV e caracterizar o perfil de morte celular das células infectadas;
ii. Determinar a eferocitose, por BMDC de células SH-SY5Y apoptóticas infectadas por ZIKV (ZIKV-iAC);
iii. Caracterizar o perfil de ativação de células dendríticas, BMDC após a eferocitose de ZIKV-iAC;
iv. Determinar a ativação de clones de linfócitos T $CD4^+$ autorreativos e o perfil de diferenciação de linfócitos Th1/Th17 mediante a eferocitose de ZIKV-iAC por BMDC.

5. METODOLOGIA

5.1. Cultivo celular

A linhagem celular SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) foi mantida em meio DMEM-F12 (Lonza) com 10% de soro bovino fetal (FBS) e gentamicina 0,1%, o cultivo foi realizado em frasco para cultivo celular, mantidos em incubadora à 37°C e 5% CO_2. Estas células foram cultivadas em meio DMEM-F12 10% FBS com antibiótico gentamicina (10µg/mL). As trocas de meio de cultura foram realizadas em dias alternados. As células oriundas de *Aedes albopictus* C6/36 foram mantidas em meio *Leibovitz's* L-15 suplementado com FBS 10%, triptose e gentamicina em incubadora "*Bio-Oxygen Demand*" (BOD) à 28°C.

5.2. Cultivo Viral

As células foram infectadas com a cepa PE243 de linhagem asiática e isolada no Estado de Pernambuco, Brasil, no ano de 2015. Os experimentos de infecção viral foram realizados por nossa colaborada Profa. Dra. Pryscilla Fanini Wowk do Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz – Paraná. Células C6/36 foram cultivadas em meio completo FBS 10% em BOD a 28°C até atingir a confluência de 70%. As garrafas de cultura T175 foram lavadas duas vezes com PBS e em seguida infectadas (MOI 0,1) durante 7 dias à 28ºC. O sobrenadante da garrafa foi centrifugado, dividido em alíquotas e congelado a -80°C. Células C6/36, não infectadas, foram mantidas com meio L-15 completo. O sobrenadante da cultura não infectada (Mock) também foi centrifugado, dividido em alíquotas de congelado a -80°C. A condição Mock foi utilizada como controle negativo.

5.3. Titulação dos estoques virais

Células C6/36 foram transferidas para placas de 24 poços ($1x10^5$/ poço) e, após aderência por 24h, uma alíquota de cada estoque viral foi diluída em meio L-15 sem soro de forma seriada até a diluição final de 10^9. Uma alíquota da diluição viral, Mock ou somente meio foi adicionada às placas em duplicata e incubadas por 1 hora em BOD a 27ºC. Após a incubação, o sobrenadante foi retirado e adicionado o meio de cobertura (1:1 de meio L-15, 10% FBS, 0,52%

triptose, 0,5µg/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 mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos 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. Posteriormente, a células foram lavadas e incubadas com o anticorpo 4G2 (anti-proteína E de Flavivírus) primário (1:400) por 1 hora a 37°C e em seguida adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo “conjugado com fosfatase alcalina na diluição de 1:7.500 por 1 h a 37°C e 5% CO_2. 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. Os experimentos de titulação da infecção viral foram realizados por nossa colaborada Profa. Dra. Pryscilla Fanini Wowk do Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz – Paraná.

5.4. Ensaio de infecção de ZIKV SH-SY5Y

As células da linhagem SH-SY5Y foram infectadas com a cepa ZIKV PE243. Assim, 10^6 células foram adicionadas em placa de *petri* (100x20mm) e cultivadas por 24 horas. Após a aderência, o sobrenadante de cultura foi retirado, as células foram lavadas com 5mL de PBS, e os inóculos virais foram adicionados utilizando o MOI 1, 5 e 10 por 1h a 37°C e 5% CO_2. Após 1h, o sobrenadante foi removido e então as células foram lavadas com 5mL de solução tampão PBS, e um novo meio de cultura DMEM-F12 (Lonza) com 10% de soro bovino fetal (FBS) e gentamicina 0,1% foi adicionado e após 24, 48 e 72, 96 e 120h de incubação a 37ºC e 5% de CO^2, as células foram lavadas (PBS), e então tripsinizadas 0,25%. Para avaliação da taxa de infeção, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando o kit de *CytoFix* e *CytoPerm* (*BD Biosciences*) seguindo as especificações do fabricante. As células foram incubadas com anticorpo 4G2-FITC (1:600). A taxa de infecção foi verificada por citometria de fluxo (*Cytoflex,*

Beckman Coulter). As porcentagens de infecção foram determinada utilizando o software *CytExpert*.

5.5. Padronização e avaliação da taxa de apoptose

Para indução da morte celular por apoptose, as células foram irradiadas (UV-C) na intensidade de 3mJ, 5mJ e 10mJ utilizando o equipamento Bio-Link (*Vilber Lourmat*). Após a irradiação e incubação por 18h, as células foram coletadas e fixadas com *Cytofix/CytoPerm* (BD) e, em seguida, ligações inespecíficas foram bloqueadas utilizando uma solução proteica de 2% de BSA em PBS, por 1 hora. A avaliação da taxa de apoptose foi realizada através da marcação com um anticorpo primário anti-caspase-3 clivada (1:800) durante uma hora, em temperatura ambiente, seguida de um anticorpo secundário conjugado com o fluorocromo *AlexaFluor* 488 (1:2500) durante 30 minutos, em temperatura ambiente. A taxa de células positivas para Caspase-3 foi verificada por citometria de fluxo (*Cytoflex, Beckman Coulter*). A porcentagem de apoptose foi determinada utilizando o software *CytExpert*.

5.6. Separação de células infectadas e apoptóticas por *Sorting*

Realizamos a seleção de células positivas para 4G2-FITC+, utilizando BD FACSAria™ *Cell Sorter*. As células foram previamente infectadas e, após 48 horas, foram irradiadas com uma intensidade de 5mJ para indução de apoptose celular. Após 18 horas da indução da apoptose, as células foram coletadas, fixadas e marcadas com o anticorpo anti-4G2.

5.7. Diferenciação de células dendríticas derivadas de precursores da medula óssea (BMDC)

As BMDCs foram diferenciadas a partir de precursores da medula óssea coletados do fêmur e tíbia de animais C57BL/6 selvagens. As células precursoras foram cultivadas em placas de Petri (100x20mm) na concentração de $1x10^6$ células/mL, em volume final de 10mL de meio RPMI completo (RPMI-C), contendo 10% de SBF e 10µg/mL de gentamicina, adicionado de 20ng/mL de GM-CSF, por sete dias em estufa de CO_2 a 37ºC, com re-estimulação no terceiro dia (adicionado 10ml de meio RPMI-C e 20ng/ml de GM-CSF) e sexto dia (10ml do sobrenadante foi coletado, as células foram centrifugadas e posteriormente foi adicionado 10ml

RPMI-C e 20ng/ml de GM-CSF). No sétimo dia, as DCs foram coletadas, o número de células viáveis foi determinado utilizando exclusão por *Trypan Blue Stain* e ajustadas para o número de células necessárias para realização do ensaio de eferocitose.

5.8. Ensaio de eferocitose

Para a avaliação da eferocitose, após o período de infecção, as células apoptóticas infectadas por ZIKV ou não infectadas foram irradiadas, incubadas, e incubadas com PKH67. Em seguida, as células BMDC foram cocultivadas na proporção de 1 BMDC para 3 células apoptóticas (1:3), por 18 h em estufa de CO_2 a 37ºC. Após esse período, as células foram marcadas com o corante *Fixable Viability Stain* 780 para avaliar a viabilidade das células dendríticas e excluir células mortas para análise. Após a marcação, as BMDCs foram fixadas com PBS/PFA 4% por 15 minutos a 4°C. Foi realizado o bloqueio prévio de ligações inespecíficas com *FcBlock* (*BD Biosciences)* por 10 minutos a 4°C. As BMDCs foram incubadas com os anticorpos anti-CD11c, anti-Ia[b] (MHC de classe II), anti-CD86, anti-CD40 e anti-PD-L1. A taxa de eferocitose e a expressão de marcadores de ativação foram determinados por citometria de fluxo (*Cytoflex, Beckman Coulter*), análise foi conduzida utilizando o software *CytExpert*.

5.9. Quantificação de citocinas

Após 18h de co-cultura, o sobrenadante foi coletado 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-23 (*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*).

5.10. Isolamento de células T CD4$^+$ *naive* e ensaio de diferenciação de linfócitos T

As células T CD4$^+$ *naive* foram isoladas de baços de camundongos C57BL/6 usando o Kit de Isolamento de Células T CD4$^+$CD62L$^+$ *naive* (*Miltenyi Biotech*), de acordo com o protocolo do fabricante. Aproximadamente 5x10^5 células T CD4$^+$ *naive* foram cultivadas na presença de 250µL de meio condicionado oriundo da co-cultura das condições de BMDCs, BMDC+AC ou BMDC+ZIKV-iAC, e 250µL de meio fresco *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) suplementado com 10% de FBS, 1nM de aminoácidos não essenciais, 1mM de L-glutamina, 1nM de piruvato de sódio, 55µM de 2-β-mercaptoetanol, 4µg/mL de anti-CD3, 2µg/mL de anti-CD28 e 5 µg/mL de anti-IL-2, anti-IL-4 e anti-IFN-γ (BD). Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para quantificação de citocinas por ELISA. Como controles positivos de diferenciação de Th1 e Th17, linfócitos T CD4$^+$ *naive* foram cultivadas em condições polarizantes para Th17 (IL-6: 20 ng/mL, TGF-β: 5 ng/mL, IL-23: 50 ng/mL, IL-1β: 20 ng/mL e anti-IFN-γ: 2,5 µg/mL) e Th1 (IL-2: 20 ng/mL e IL-2: 50 ng/mL).

5.11. Avaliação da diferenciação de linfócitos T CD4$^+$ por citometria de fluxo

Após o processo de diferenciação, o sobrenadante foi coletado para posterior dosagem de IL-17A e IFN-γ, como descrito anteriormente. As células foram então estimuladas por 3 horas com 0,1µg/mL de PMA (Sigma) e 0,5µg/mL de Ionóforo de cálcio (A23187), na presença de 10 µg/mL de Brefeldina A (Sigma). Em seguida, as células foram incubadas com um corante para avaliação da viabilidade celular (*Fixable Viability Dye, eBioscience*), marcadas com anti-CD4 e submetidas à fixação e permeabilização, seguindo as instruções do fabricante (Foxp3 *Transcription Factor Staining Buffer Set, eBioscience*). Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpos anti-IL-17A, anti-Foxp3 e anti-IFN-γ. A aquisição das células foi realizada em um citômetro *Cytoflex* e a análise foi conduzida utilizando o software *CytExpert*.

5.12. Incorporação de ovoalbumina (OVA) por choque osmótico

Para avaliar a ativação de clones de linfócitos T CD4 autorreativos mediante a eferocitose de ZIKV-iAC, utilizamos o protocolo de incorporação de OVA utilizando choque osmótico, como descrito previamente por Hann *et al.,*2020 (Den Haan *et al.,*2000). Para validar o protocolo de incorporação de OVA, $2{,}5\times10^7$ células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y foram incubadas em 170 µL de meio hipertônico (sacarose 0,5M, 10% p/vol polietilenoglicol 1000 e HEPES 10 mM em RPMI, pH 7,2), na presença ou ausência de de 10 mg/ml de OVA-FITC a 37°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 2,2 mL de meio hipotônico pré-aquecido (60% RPMI e 40% H_2O), por subsequente 2 minutos de incubação, a 37°C. A suspensão de células foi submetida a centrifugação, submetidas a duas lavagens com PBS, e então e adicionado RPMI contendo 10% FBS. A incorporação OVA-FITC+ foi confirmada pela aquisição das células por citometria de fluxo (*Cytoflex)* e a análise dos resultados foi conduzida utilizando o software *CytExpert*. Além disso, a avaliação de células OVA-FITC$^+$ confirmada também microscopia de fluorescência.

5.13. Ensaios proliferação de linfócitos T CD4$^+$ OT-II

As células T CD4$^+$ *naive* foram isoladas a partir de células do baço de animais OT-II utilizando *beads* magnéticas (marca), conforme previamente descrito. Uma parte das células T CD4$^+$ OT-II foi incorporada CFSE (2,5 uM), de acordo com instruções do fabricante, para determinação da proliferação celular. As células apoptóticas infectadas com ZIKV ou não infectadas, conjugadas com OVA, foram co-cultivadas com BMDC na proporção de 1 BMDC para 3 células apoptóticas (1:3) e incubadas por 18h, em estufa de CO_2 a 37ºC. Após esse período, as células foram submetidas centrifugação, e o sobrenadante foi armazenado. Elas foram então submetidas a um ciclo de lavagem com PBS aquecido, para remoção das células apoptóticas não fagocitadas. Após esse procedimento, o sobrenadante (meio condicionado) oriundo da co-cultura de BMDC+AC, foi novamente adicionado à co-cultura de linfócitos T CD4$^+$ *naive* e BMDC (após a eferocitose) na proporção de 1 BMDC para 2 linfócitos T CD4+ (OT-II), sendo então incubadas por um período de 5 dias, em estufa de CO_2 a 37ºC. Como controle interno do ensaio de proliferação, BMDCs foram

incorporadas diretamente com OVA na presença ou ausência de estimulação por LPS e cultivadas com linfócitos OT-II. Além disso, como controle positivo de proliferação, anticorpos anti-CD3 foram adicionadas as condições AC e ZIKV-iAC. Após 5 dias, os linfócitos foram coletados para determinação da proliferação celular por citometria de fluxo (*Cytoflex)* avaliano os ciclos de proliferação pela diluição de CFSE e o sobrenadante da cultura foi coletado para dosagem de IL-17A e IFN-γ (Campisi *et al.,*2016). Análise dos resultados foi conduzida utilizando o software *CytExpert*.

5.14. Análise da expressão de alvos gênicos por qPCR

O RNA proveniente da co-cultura foi isolado de acordo de acordo com orientações do fabricante (*RNeasy Mini Kit, Qiagen*). Subsequentemente, realizou-se a sintede de cDNA utilizando o *iScript cDNA Synthesis* Kit da BioRad. A avaliação da expressão de genes alvos foi conduzida por meio da técnica de qPCR, empregando *SybrGreen* e *primers* específicos para os genes de interesse. A expressão relativa do gene de interesse foi determinada pela quantificação da amplificação, utilizando a fórmula $2^{-\Delta CT}$. Essa análise comparou os valores de Ct com a expressão do gene endógeno 18S, utilizando o método de controle. A qPCR foi executada utilizando o termociclador ABI Prim 7500 (ThermoFischer), e os primers empregados estão detalhados na tabela a seguir:

Primers utilizados

Gene	Oligonucleotídeo F 5'-3'	Oligonucleotídeo R 5'-3'
Ifna1	GGATGTGACCTTCCTCAGACTC	ACCTTCTCCTGCGGGAATCCAA
Ifna2	ATCCAGAAGGCTCAAGCCATCC	GGAGGGTTGTATTCCAAGCAGC
Stat1	GCCTCTCATTGTCACCGAAGAAC	TGGCTGACGTTGGAGATCACCA
18S	CTCAACACGGGAAACCTCAC	CGCTCCACCAACTAAGAACG

5.15. Avaliação da ativação de células dendríticas derivadas de monócitos humanos (MoDCs) após a eferocitose de ZIKV-iAC

Amostras de sangue periféricos (20mL) de 5 doares saudáveis foram coletadas em tubos com heparina (Número do protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa: 4.614.853), para subsequente isolamento de células mononucleares (PBMCs), utilizando método de gradiente por *Ficoll* (*Sigma-Aldrich, St. Louis*, MO, EUA). Em seguida, os monócitos foram isolados a partir dos PBMCs, utilizando-se *beads* magnéticas anti-CD14 (CD14 *microbeads* #130-050-201, *Miltenyi Biotec).* Os monócitos CD14+ ($1x10^6$ células/mL), purificados dos PBMCs, foram diferenciados em células dendríticas, na presença de GM-CSF (50 ng/mL) e IL-4 (20ng/mL) (*Peprotech*) em meio de cultura RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich*) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 0,1% de antibióticos (penicilina 100 U/ml e 0,1 mg/mL estreptomicina. As células foram mantidas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 a 37°C por seis dias (Schulz, Severin et al. 2019). Em seguida, as células dendríticas diferenciadas de monócitos (MoDCs) foram cocultivadas na presença de células infectadas com ZIKV ou não infectadas (Mock), previamente irradiadas com UV-C (5mJ) e marcadas com PKH67. Após 18h de co-cultura, as células coletadas e incubadas com o corante *Fixable Viability Stain 780* para determinar a viabilidade celular. Após a marcação, as células foram fixadas com PBS com PFA (paraformoldeído) 4% por 15 minutos a 4°C e realizado o bloqueio com 10% de soro de doadores AB+, por 15 minutos, a 4°C. Posteriormente as células foram incubadas com anticorpos anti-CD11c, anti-CD86, anti-HLA-DR e anti-PD-L1 em solução de PBS com FBS a 2%, por 30 minutos a 4°C.

5.16. Quantificação de citocinas produzidas pelas MoDCs

Após o ensaio de eferocitose, os sobrenadantes orindos da co-cultura foram coletados e armazenados em ultrafreezer. Posteriormente, as quantificações de IL-1β, IL-6, TNF-α e IL-10 (BD *Biosciences)* foram realizadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante.

5.17. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± SEM e analisados utilizando o programa estatístico Prism 8.0 (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Foram realizadas análises utilizando teste *T student* para comparações entre dois grupos experimentas ou análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni ou Tukey com múltiplas comparações para grupos experimentais maiores ou iguais a três. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas se $p \leq 0,05$.

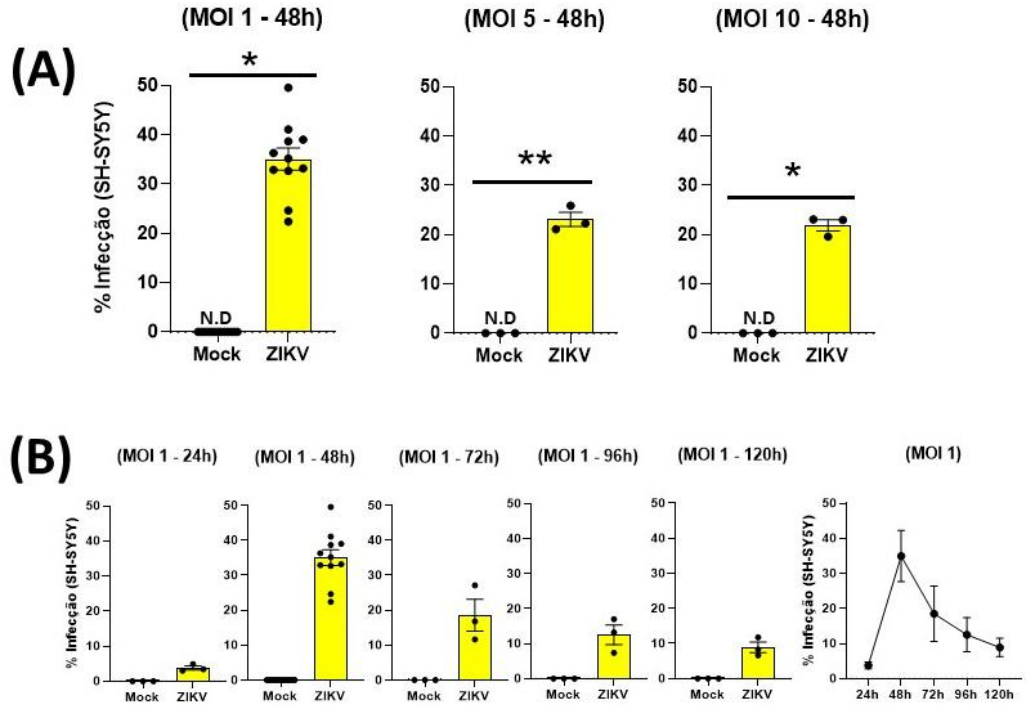
6. RESULTADO

6.1. Padronização da infecção e indução de apoptose nas células da linhagem SH-SY5Y infectadas com ZIKV

Inicialmente, realizamos a padronização da infecção em células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y, utilizando diferentes MOIs (Multiplicity of Infection) da cepa do ZIKV PE243 em diferentes períodos de infecção. Para isso, expusemos as células da linhagem SH-SY5Y aos MOIs (1, 5 e 10) da cepa do ZIKV PE243, por um período inicial de 48 horas (conforme observado em estudos anteriores) (ALPUCHE-LAZCANO et al.,2018; BONENFANT et al.,2020; LIMA et al.,2019; SÁNCHEZ-SAN MARTÍN et al.,2018). Posteriormente, coletamos as células, realizamos a permeabilização e incubação com o anticorpo anti-4G2 para posterior análise por citometria de fluxo. Observamos que na condição MOI 1, houve uma maior taxa de infecção, com uma média de aproximadamente 35% de células positivas para o anticorpo anti-4G2, em comparação com as condições de MOI 5 e 10, em que observamos uma taxa de aproximadamente 25% de células infectadas.

Em seguida, investigamos se o tempo de incubação com o vírus poderia ser uma variável importante para obter uma taxa de infecção mais significativa nessa linhagem celular. Para isso, as células foram incubadas com MOI 1, e o percentual de infecção foi avaliado após 24, 48, 72, 96 e 120 horas (Figura 3-B). Após 48 horas de infecção, observamos o pico mais elevado na taxa de infecção, ou seja, a maior porcentagem de células positivas para o anticorpo anti-4G2. Nos períodos subsequentes, constatamos uma diminuição na porcentagem de células infectadas em comparação ao tempo de 48 horas de exposição (Figura 3, B). Nossos resultados estão em consonância com estudos prévios na literatura, que evidenciam que o período de 48 horas parece ser suficiente para o estabelecimento da infecção pelo ZIKV (Alpuche-Lazcano *et al.,*2018; Bonenfant *et al.,*2020; Lima *et al.,*2019; Sánchez-San Martín *et al.,*2018).

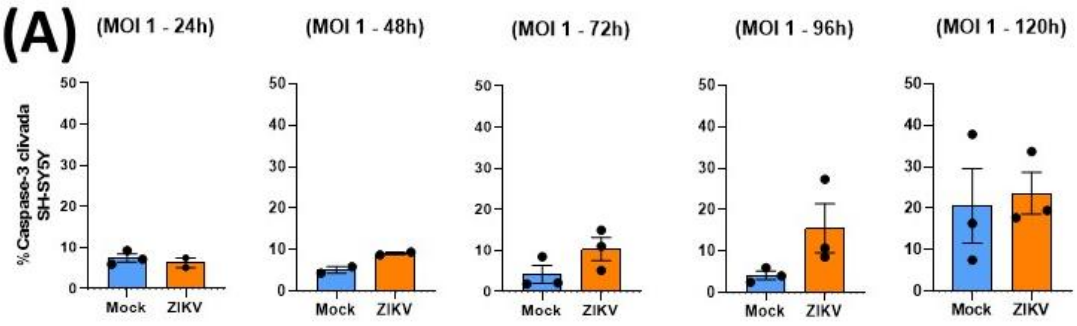
Figura 3. Taxa de infecção e indução de apoptose de células da linhagem neuronal SH-SY5Y.



Células da linhagem SH-SY5Y foram submetidas à infecção com a cepa ZIKV PE243 (MOI de 1, 5 e 10) por 48h, marcadas intracelularmente com anticorpo anti-4G2-FITC e analisadas por citometria de fluxo. A taxa de infecção é representada pela porcentagem de células 4G2-FITC+. (A) Gráfico de barras apresentando a média de células positivas para 4G2-FITC a partir dos diferentes MOIs. (B) Gráfico de barras apresentando porcentagem de células positivas para 4G2-FITC após diferentes tempos de incubação. Cada ponto representa um experimento independente. *p<0,05. Fonte: Autor

Visto que nossa hipótese se sustenta no impacto da eferocitose de células apoptóticas infectadas pelo ZIKV na ativação de BMDCs, procedemos à avaliação da taxa de apoptose na linhagem SH-SY5Y após a infecção. Para isso, as células foram infectadas com um MOI de 1, e a apoptose celular, induzida exclusivamente pela infecção do ZIKV, foi em determinada diferentes tempos após a infecção (24, 48, 72, 96 e 120h), utilizando o anticorpo anti-caspase 3-clivada. A porcentagem de apoptose celular induzida apenas pela infecção por ZIKV não ultrapassou 15% em comparação com a condição de controle (Mock), após 48h de infecção (Figura 4-A). Tampouco a variação no tempo de infecção foi hábil em induzir o aumento da apoptose celular nas etapas subsequentes. Portanto, optamos por utilizar a condição de MOI 1 e o período de 48h de infecção nos próximos experimentos, uma vez que não houve aumento na taxa de infecção em relação às variáveis MOI/tempo, nem em relação à apoptose celular.

Figura 4. Taxa de apoptose após a infecção por ZIKV

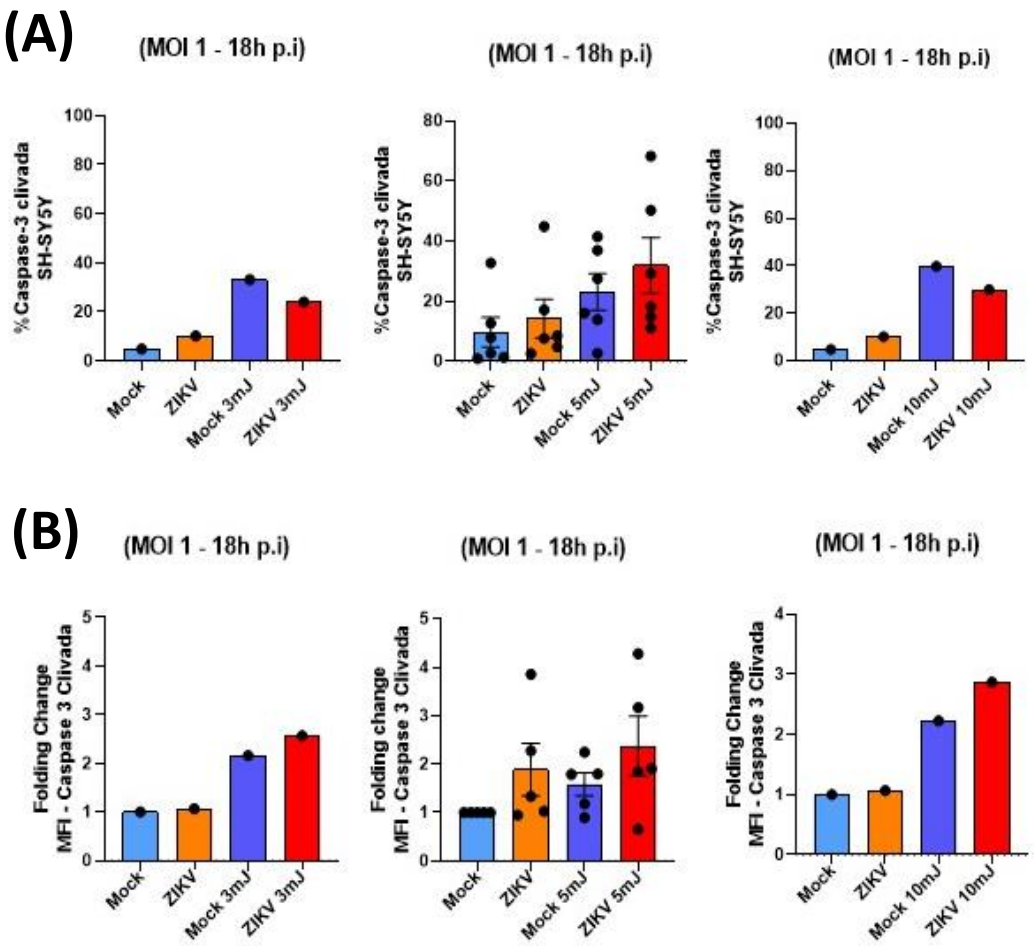


Células da linhagem SH-SY5Y foram submetidas à infecção com a cepa ZIKV PE243 por 24, 48, 72, 96 e 120h (MOI de 1). Após 48h de infecção as células foram coletadas e marcadas com anti-caspase 3-cliavada para subsequente análise por citometria de fluxo da taxa de infecção e apoptose. (A) Gráfico de barras representativo da porcentagem de células SH-SY5Y positivas para caspase 3-clivada-FITC. Cada ponto representa um experimento independente. Fonte: Autor

Na tentativa de aumentar a taxa de morte celular em células infectadas com o ZIKV, adotamos uma abordagem alternativa, utilizando a radiação com UV-C após as 48h de infecção. A morte celular induzida por UV-C é um protocolo bem estabelecido na literatura e em nosso grupo de pesquisa (Dejani *et al.,*2018; Gentile *et al.,*2003; Lipiec *et al.,*2014; S. Takeuchi *et al.,*2016). Após 48h de infecção por ZIKV, as células foram irradiadas utilizando três intensidades de UV-C (3, 5 e 10mJ), seguidas de 18 horas de incubação. Em seguida, as células foram coletadas, marcadas com anticorpo anti-caspase 3-clivada e analisadas por citometria de fluxo. A intensidade de 5mJ mostrou-se mais eficiente tanto na porcentagem de apoptose (~30%) quanto no rendimento do número de células recuperadas após a irradiação (Figura 2 A-B).

Na condição de controle (Mock) obtivemos em torno de 26% de apoptose celular. Essas células foram também marcadas com *Viability stain*, no qual observamos uma porcentagem inferior a 3-4% de células com permeabilidade de membrana, portanto, sem contaminação de células com perfil de morte diferente de apoptose (Dados não mostrados).

Figura 5. Taxa de apoptose após a indução por UV-C



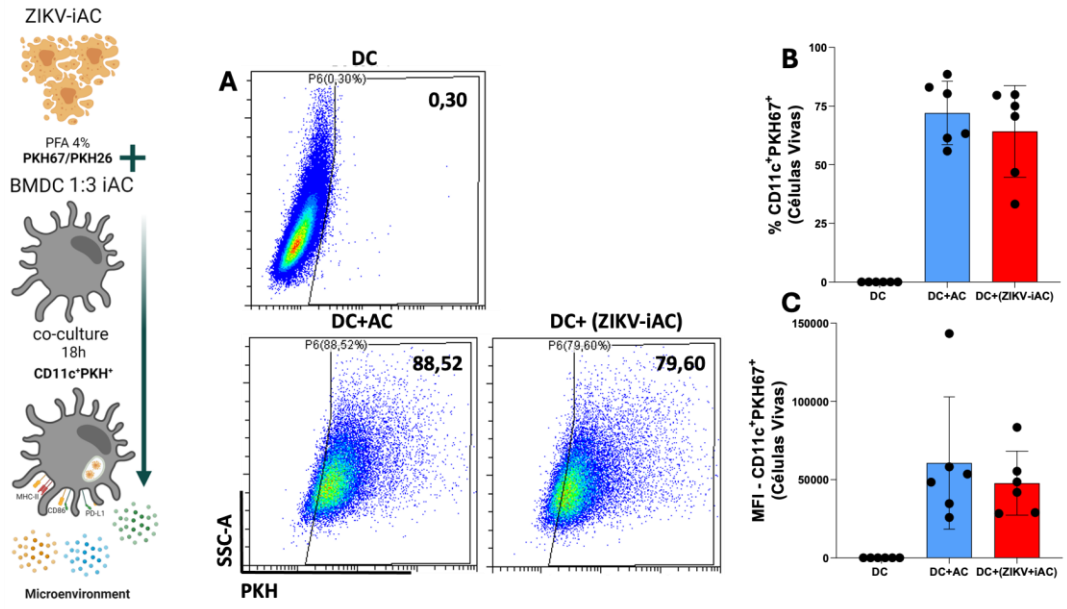
As células da linhagem SH-SY5Y foram submetidas à infecção com a cepa ZIKV PE243 por 48h (MOI de 1). Após 48h de infecção as células foram irradiadas na intensidade de 3, 5 e 10mJ, e após 18h a porcentagem de células positivas para Caspase 3-clivada foi determinada. As células foram marcadas com anti-caspase-3 clivada e a analisadas por citometria de fluxo. (A) Gráfico de barras apresentando porcentagem de células positivas para Caspase 3-clivada-FITC. (B) Gráfico de barras apresentando o MFI de células positivas para Caspase 3-clivada-FITC. Cada ponto representa um experimento independente. *p<0,05. Fonte: Autor

6.2. Avaliação da capacidade fagocítica de AC e ZIKA-iAC por BMDCs

Para compreender o perfil de ativação de DCs em resposta à eferocitose de células apoptóticas, avaliamos inicialmente a taxa de eferocitose nas diferentes condições experimentais, células apoptóticas não infectadas (Mock) (DC+AC) e infectadas (DC+ZIKV-iAC). As co-culturas foram conduzidas utilizando a proporção de 1 DC para 3 AC/ZIKA-iAC (1:3), por um período de 18h. As células apoptóticas (AC e ZIKA-iAC) foram previamente marcadas com PKH67 e a taxa

de eferocitose foi avaliada por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstraram que as DCs foram capazes de eferocitar tanto as células AC (~74% DC-PKH$^+$) quanto as células ZIKA-iAC (~72% DC-PKH$^+$), não apresentando diferenças estatisticamente significativas em relação à porcentagem ou intensidade de fluorescência média (Figura 6). Apesar da radiação UV-C ter induzido uma porcentagem de células apoptóticas aquém do esperado para dar início aos ensaios de co-cultura, a proporção de 3 células AC/iAC para 1 DC parece ser suficiente para garantir que a maioria das células dendríticas fagocitassem ao menos uma célula AC ou ZIKV-iAC.

Figura 6. BMDCs são capazes de eferocitar células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV.



As células SH-SY5Y (neuroblastoma) na presença de Mock e irradiadas com UV-C (AC) e as células SH-SY5Y infectadas com ZIKV e irradiadas com UV-C (ZIKV-iAC) foram previamente marcadas com PKH67 e co-cultivadas com BMDC por 18h. A taxa de eferocitose foi avaliada por citometria de fluxo, indicada pela porcentagem de células viáveis CD11c positivas para PKH67. (A) Dot-plot representativo da porcentagem de células CD11c$^+$PKH67$^+$. (B) Gráfico de barras apresentando a porcentagem de eferocitose pela dupla marcação CD11c$^+$PKH67$^+$ e a mediana (C) da intensidade de fluorescência (MFI) de células CD11c+PKH67+. (B e C) Cada ponto representa um experimento independente. Fonte: Autor

6.3. Determinação do fenótipo de BMDC (DCs) e de MoDC e produção de citocinas após a eferocitose de células apoptóticas infectadas por ZIKV (ZIKA-iAC)

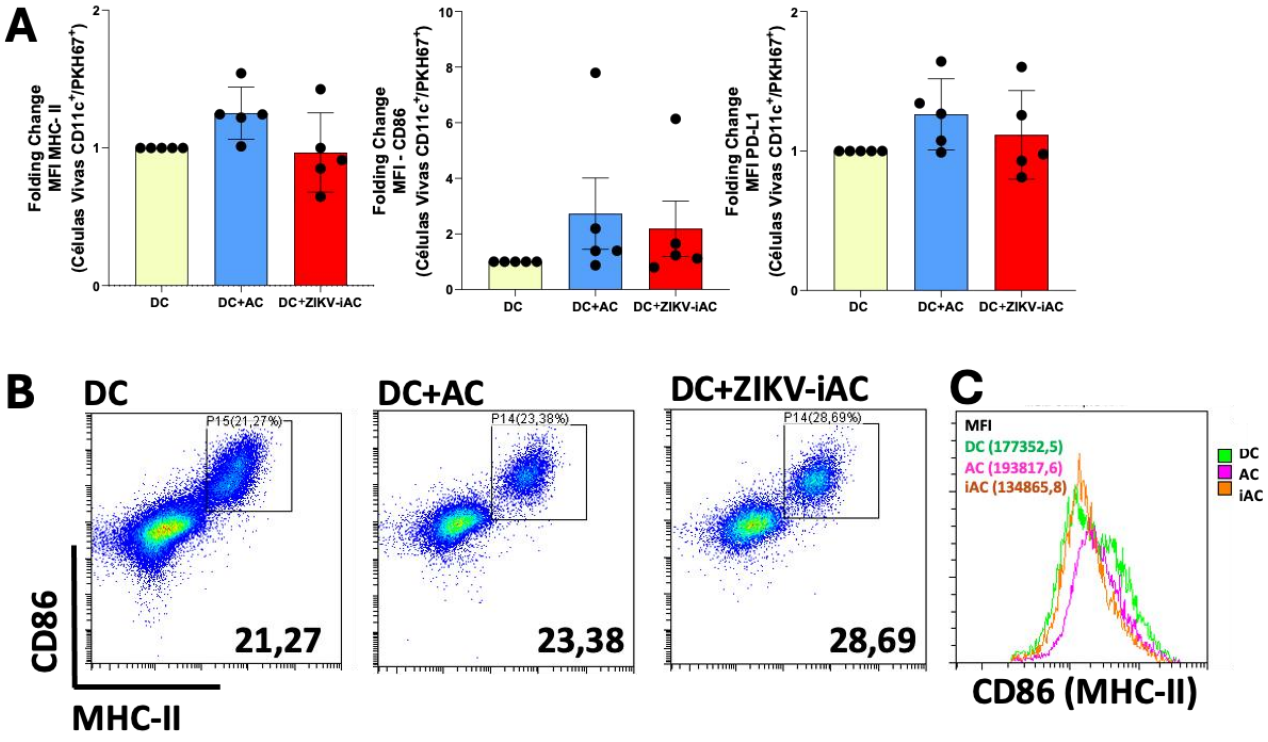
Após a determinação da taxa de eferocitose, a próxima etapa consistiu em avaliar o perfil de ativação das BMDCs após a eferocitose de AC e ZIKA-iAC. Após

18h de co-cultura, DCs viáveis foram avaliadas quanto a expressão de moléculas de CD86, MHC-II e PD-L1 em células $CD11c^+/PKH67^+$, ou seja, DCs contendo células apoptóticas em seu interior. Surpreendentemente, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na porcentagem ou no MFI na expressão das moléculas CD86, MHC-II ou PD-L1 em DC, quando comparado as condições DC+AC, DC+ZIKA-iAC ou DCs (sem a presença de ACs) (Figura 7 A-C).

Como previsto em nossos objetivos, visando validar os resultados obtidos utilizando células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos (BMDC), avaliamos também o impacto da eferocitose de ZIKA-iAC utilizando células dendríticas derivadas de monócitos humanos (MoDC). Confirmando os resultados obtidos com BMDC, a eferocitose de ZIKA-iAC por MoDC não promoveu a modulação na expressão moléculas de HLA-DR, CD86, e PD-L1 em células $CD11c^+$ ou $CD11c^+/PKH67^+$, tanto em porcentagem (Figura 8 A, B, C) quanto em MFI (D, E, F), quando comparado as condições MoDC ou MoDC+AC.

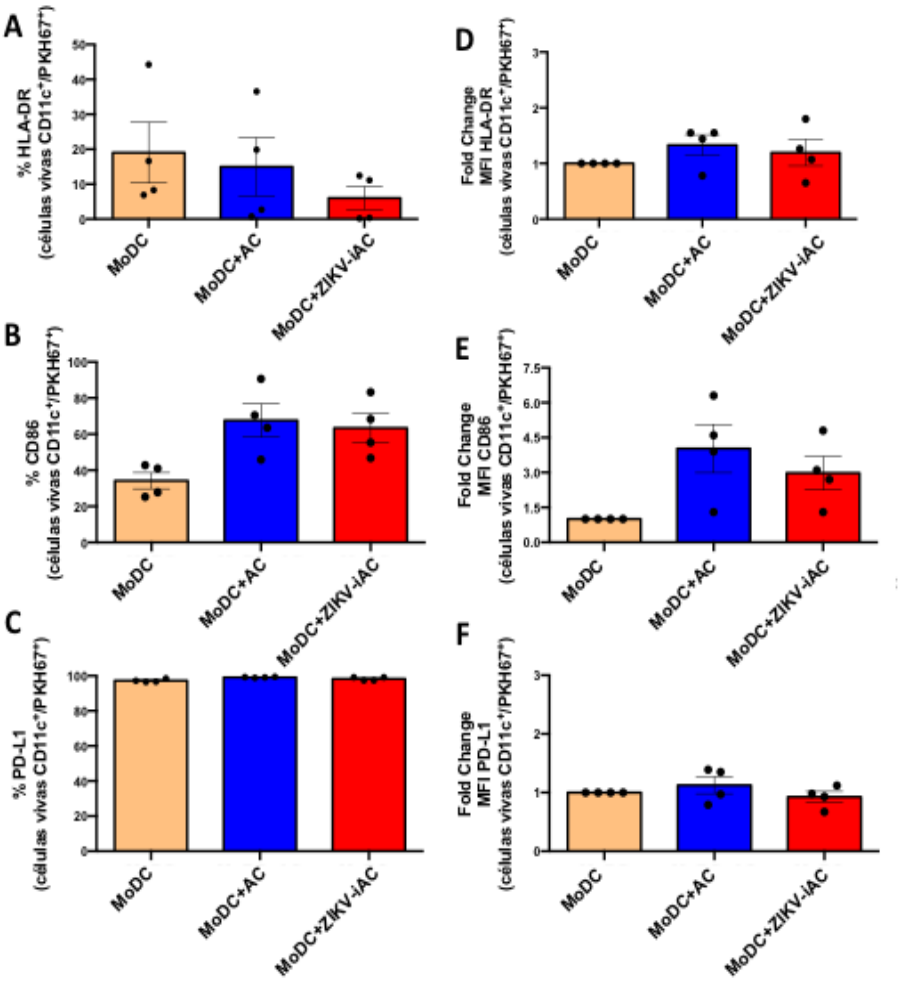
Portanto, até o momento, os resultados sugerem que a eferocitose de ZIKV-iAC parece não induzir um perfil de ativação de BMDC. Esses resultados diferem da nossa hipótese inicial que a eferocitose de ZIKV-iAC poderia ativar as DCs e induzir a apresentação tanto de peptídeos próprios (oriundo a ACs) como virais, e que a presença do PAMP (viral) induziria um perfil de maturação nas DCs, tornando-as hábeis em induzir a ativação de clones autorreativos, dependendo do microambiente gerado durante a eferocitose.

Figura 7. Fenótipo de BMDCs após eferocitose de células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV.



As células SH-SY5Y na presença de Mock e irradiadas com UVC (AC) e células SH-SY5Y infectadas e irradiadas com UVC (ZIKV-iAC) foram previamente marcadas com PKH67 e co-cultivadas com BMDC na proporção de 1:3 por 18h. Após esse período, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo quanto a expressão dos marcadores CD86, MHC-II e PD-L1. (A) Gráfico de barras apresentando o MFI de células expressando moléculas de MHC-II, CD86 e PD-L1 na população de células vivas $CD11c^{+}PKH67^{+}$. (B) Dot-plot representativo da porcentagem de células expressando CD86, MHC-II dentro da população de células $CD11c^{+}PKH^{+}$vivas. (C) Histograma apresentando o MFI de células expressando CD86 dentro da população $CD11c^{+}PKH67^{+}MHC\text{-}II^{+}$. Cada ponto representa um experimento independente. Fonte: Autor

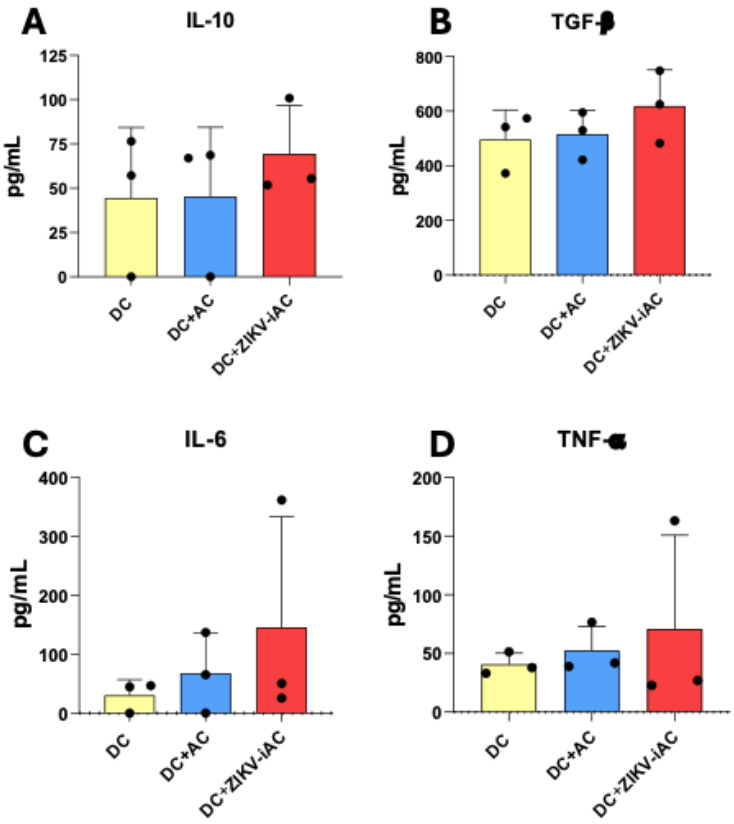
Figura 8. Fenótipo de MoDCs após a eferocitose de células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV.



Células dendríticas derivadas de monócitos humanos (MoDCs) foram cocultivadas na presença de células SH-SY5Y (neuroblastoma) não infectadas (Mock), irradiadas e marcadas com PKH67 (MoDC+AC) ou com células SH-SY5Y infectadas com ZIKV, irradiadas e marcadas com PKH67 (MoDC+ ZIKV-iAC). Após 18h de co-cultura , as células foram coletadas, marcadas com Fixable Viability Stain, fixadas, e posteriormente marcadas anti-CD11c, anti-HLA-DR, anti-CD86 e anti-PD-L1 para análise por citometria de fluxo. Gráficos de barras apresentando a porcentagem e o MFI de células $CD11c^{+}PKH67^{+}$ expressando (A, D) HLA-DR, (B, E) CD86 e (C, F) PD-L1. N= 4 doares. Média±EPM (Erro Padrão da Média). Fonte: Autor

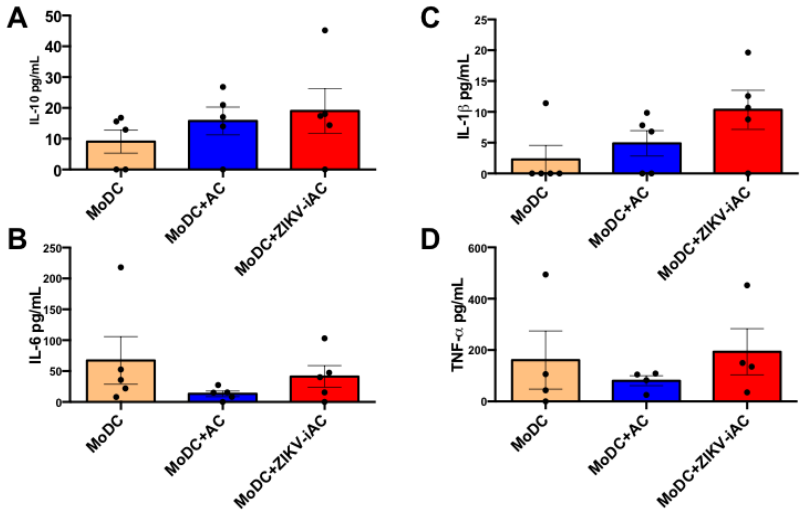
Para complementar os resultados, nós também avaliamos por ELISA o perfil das citocinas produzido por BMDCs e MoDCs mediante a eferocitose de ZIKV-iAC, quantificando no sobrenadante da co-cultura decorridas 18h de eferocitose. Corroborando os dados obtidos quanto ao fenótipo tolerogênico em BMDC e MoDC mediante a eferocitose de ZIKA-iAC, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos níveis de citocinas no sobrenadante de BMDCs ou MoDCs em condições basais ou após a eferocitose (Figura 9 e Figura 10).

Figura 9. Produção de citocinas por DCs após a eferocitose de células AC ou ZIKV-iAC.



Células não infectadas (Mock) e infectadas (ZIKV-iAC) foram cocultivadas com BMDC na proporção de 1:3 por 18h. Após esse período, o sobrenadante foi coletado para a quantificação das citocinas (A) IL-10, (B) TGF-β, (C) IL-6 e (D) TNF-α por ELISA. Cada ponto representa um experimento independente.

Figura 10. Produção de citocinas por MoDCs após a eferocitose de células AC ou ZIKV-iAC.



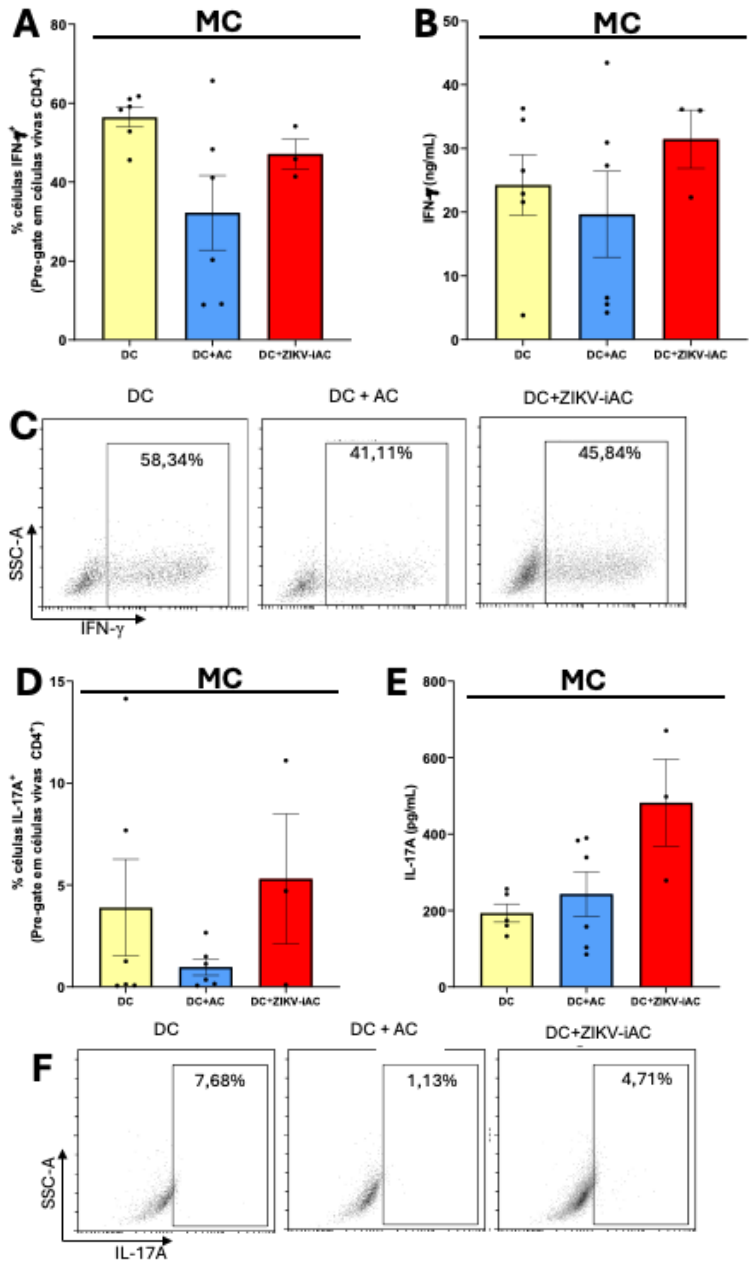
Células não infectadas (Mock) e infectadas (ZIKV-iAC) foram cocultivadas com MoDCs na proporção de 1MoDC:3AC por 18h. Após esse período, o sobrenadante foi coletado para a quantificação das citocinas (A) IL-10, (B) IL-6, (C) IL-1β e (D) TNF-α por ELISA. N= 5 doares. Média±EPM (Erro Padrão da Média).

6.4. Diferenciação de células T CD4$^+$ na presença de meio condicionado (CM) oriundo da co-cultura de BMDCs e ZIKV-iAC.

Nesta etapa, visamos avaliar o perfil de diferenciação dos linfócitos T CD4$^+$ nas subpopulações Th1, Th17 e Treg na presença do sobrenadante oriundo das co-culturas das respectivas condições: DC, DC+AC, ou DC+ZIKV-iAC. Para tanto, células T CD4$^+$ *naive* oriundas do baço de camundongos C57BL/6 foram isoladas por seleção positiva, utilizando *beads* magnéticas, e estimuladas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, na ausência de anticorpos bloqueadores, e na presença dos MCs (Meio Condicionado), oriundos das coculturas obtidas das diferentes condições experimentais. Após três dias de diferenciação, os linfócitos foram coletados para determinação dos do perfil de diferenciação dos subtipos celulares de Th. Além disso, o sobrenadante de cultura de linfócitos foi coletado para detecção de IL-17A e IFN-γ por ELISA. A presença do MC oriundo da condição DC+ZIKV-iAC não alterou a porcentagem de linfócitos T CD4$^+$/IFN-γ$^+$, ou os níveis de produção de IFN-γ, quando comparado às condições DC ou DC+AC. Vale ressaltar que o MC oriundo de DC+AC resulta em uma tendência à diminuição na porcentagem de células T CD4$^+$/IFN-γ$^+$, bem como na produção de IFN-γ, porém sem força estatística que suporte tal fenômeno (Figura 11 A, B e C). Sabe-se que apenas o estímulo com anti-CD3 e CD28, na ausência de anticorpos bloqueadores, resulta na diferenciação preferencial de linfócitos com perfil Th1. Da mesma forma, a presença do MC obtido da condição DC+ZIKV-iAC não foi hábil em modular a porcentagem de células T CD4$^+$ produtoras de IL-17A (TCD4$^+$/IL-17$^+$), comparado às condições DC ou DC+AC (Figura 11 D, E e F).

Além disso, a diferenciação de linfócitos TCD4$^+$/FOXP3$^+$ também foi avaliada nas diferentes condições experimentais, no entanto, não houve detecção desse tipo celular em nenhuma das condições avaliadas (dados não mostrados).

Figura 11. Perfil de diferenciação de linfócitos T CD4+ *naive* cultivados na presença de Meio condicionado (MC) oriundo da eferocitose de ZIKV-iAC.



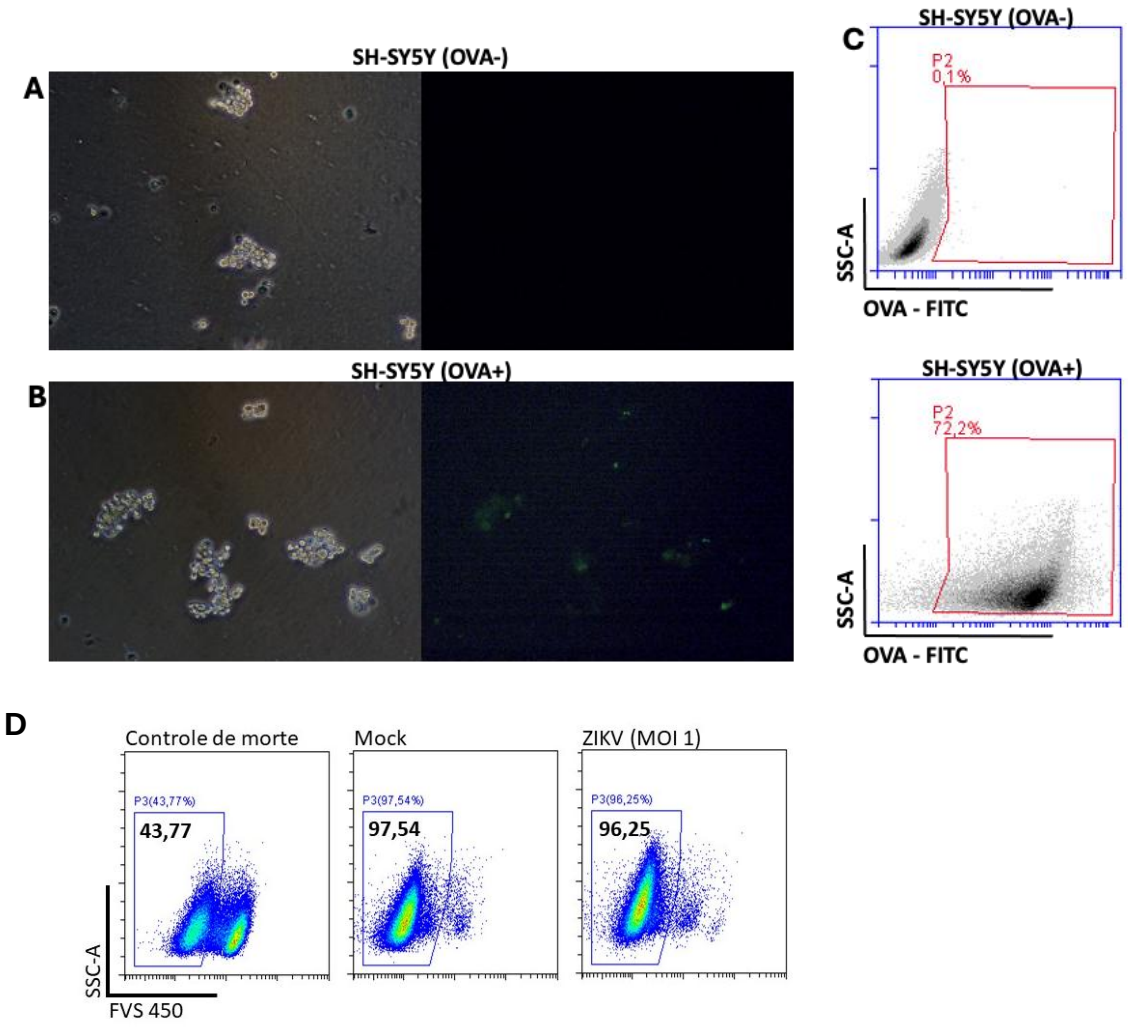
Os linfócitos T CD4$^+$ *naive* foram diferenciados na presença de anti-CD3, anti-CD28 e anti-IL-4 com o sobrenadante (MC) oriundo da condição DC, DC+AC, DC+(ZIKV-iAC). Após 72h, a porcentagem de linfócitos expressando IL-17A e IFN-γ foi determinada por citometria de fluxo com pré-seleção na população CD4$^+$ viável e o sobrenadante da cultura foi coletado para determinação dos níveis de produção de IL-17A e IFN-γ. (A) Gráfico em barra da porcentagem de células CD4$^+$IFN-γ$^+$. (B) Gráfico em barras da quantificação da produção de IFN-γ$^+$ durante 72 h de cultura. (C) Dot-plots representativos da porcentagem de linfócitos IFN-γ$^+$. (D) Gráfico em barra da porcentagem de células CD4$^+$IL-17A$^+$. (E) Gráfico em barras da quantificação da produção de IL-17A, após 72h de cultura. (F) Dot-plots representativos da porcentagem de linfócitos IL-17A$^+$. Cada símbolo no gráfico refere-se ao valor obtido de experimentos realizados de maneira individual (replicatas biológicas). Meio condicionado (MC). Fonte: Autor

6.5. Incorporação de Ovoalbumina-FITC por células apoptóticas submetidas a choque osmótico

Visando padronizar os ensaios utilizando células de animais OT-II para avaliar a ativação de clones de linfócitos autorreativos, nós padronizamos os ensaios de incorporação de OVA em ZIKA-iAC, conforme descrito previamente (Moore, M.W., et al. 1988; den Haan, J.M. et al.). Para tanto, células da linhagem SH-SY5Y foram infectadas com a cepa ZIKV PE243 (MOI de 1) e, após 48h de infecção, as células foram irradiadas na intensidade de 5 mJ, incubadas por 18h e submetidas a incorporação de OVA-FITC (Sigma) utilizando choque osmótico. Os resultados obtidos por citometria de fluxo demonstram que o choque osmótico foi eficiente um induzir a incorporação de OVA, visto que ~ 72% das células são OVA-FITC+ (Figura 12 C e D). Além disso, também foi possível observar a marcação de FITC nas células por imunofluorescência (Figura 12 A e B) ou seja, a incubação das células com OVA-FITC submetidas a choque osmótico foi capaz de promover a incorporação de OVA.

Vale ressaltar, que também avaliamos a viabilidade celular por meio da marcação das células (neuroblastomas da linhagem SH-SY5Y) com FVS 450 (*Fixable Viability Stain 450*) para garantir que o choque osmótico não leva a morte celular. Dessa forma, após o processo de conjugação de OVA por choque osmótico, as células da linhagem SH-SY5Y foram submetidas a infecção por ZIKV e após 48h as células foram coletadas e marcadas com FVS 450. As células infectadas submetidas ao processo de choque preservaram a viabilidade celular em torno de ~98% de células FVS450 negativas, como pode ser observado na Figura 12 D.

Figura 12. Incorporação de ovoalbumina (OVA) em células apoptótica infectadas ou não com ZIKV.



Células da linhagem SH-SY5Y foram submetidas à infecção com a cepa ZIKV PE243 (MOI de 1). Após 48h de infecção, as células foram irradiadas na intensidade de 5 mJ e, após 18h, as células foram submetidas à incorporação de OVA através de choque osmótico. (A, B) Imunofluorescência após a conjugação de OVA por choque osmótico. (C) Dot-plot representativo da porcentagem de células positivas para OVA-FITC. (D) As células foram marcadas com FVS 450 e analisadas por citometria de fluxo. Dot-plot representativo da porcentagem de células SH-SY5Y infectadas ou não, negativas para FVS 450. Fonte: Autor

6.6. Avaliação da proliferação e ativação de linfócitos T CD4$^+$ OT-II mediante a co-cultura de DC após eferocitose de ZIKV-iAC-OVA e AC-OVA

Após a validação de incorporação de OVA por ACs, nosso próximo passo foi avaliar se o perfil fenotípico e o microambiente produzido por DCs mediante a eferocitose de ZIKV-iAC-OVA+ seria hábil em induzir a proliferação e ativação de linfócitos T CD4$^+$ oriundo de animais OT-II, ou seja, expressando TCR específico para OVA. Para tanto, células T CD4$^+$ *naive* foram isoladas a partir de células do baço de camundongos OT-II, marcadas com

CFSE (2,5μM) para determinação da proliferação celular mediante a apresentação de OVA. As células AC e ZIKV-iAC foram conjugadas com OVA e co-cultivadas com BMDC durante 18 horas, na proporção de 1:3. Após esse período, as células não fagocitadas foram gentilmente removidas da cultura, mediante a lavagem com PBS aquecido, e os linfócitos T $CD4^+$ *naive* (OT-II) foram adicionados aos poços na proporção de 1 BMDC para 2 linfócitos T $CD4^+$ (OT-II), por um período de 5 dias (conforme descrito previamente por (Campisi *et al.,*2016). Após 5 dias de cultivo, os linfócitos foram coletados para determinação da proliferação celular (mediante a diluição de CFSE), por citometria de fluxo e o sobrenadante da cultura foi coletado para quantificação de IL-17A e IFN-γ. Tanto a eferocitose da condição AC-OVA^+ quanto da condição ZIKV-iAC-OVA^+ por DCs não foram hábeis em induzir proliferação de linfócitos $TCD4^+$/OT-II, tampouco a produção de IFN-γ por esses linfócitos após 5 dias de cultura (Figura 13). Em ambos os casos, o perfil de proliferação e produção de IFN-γ foi semelhando a controle negativo DC+RPMI.

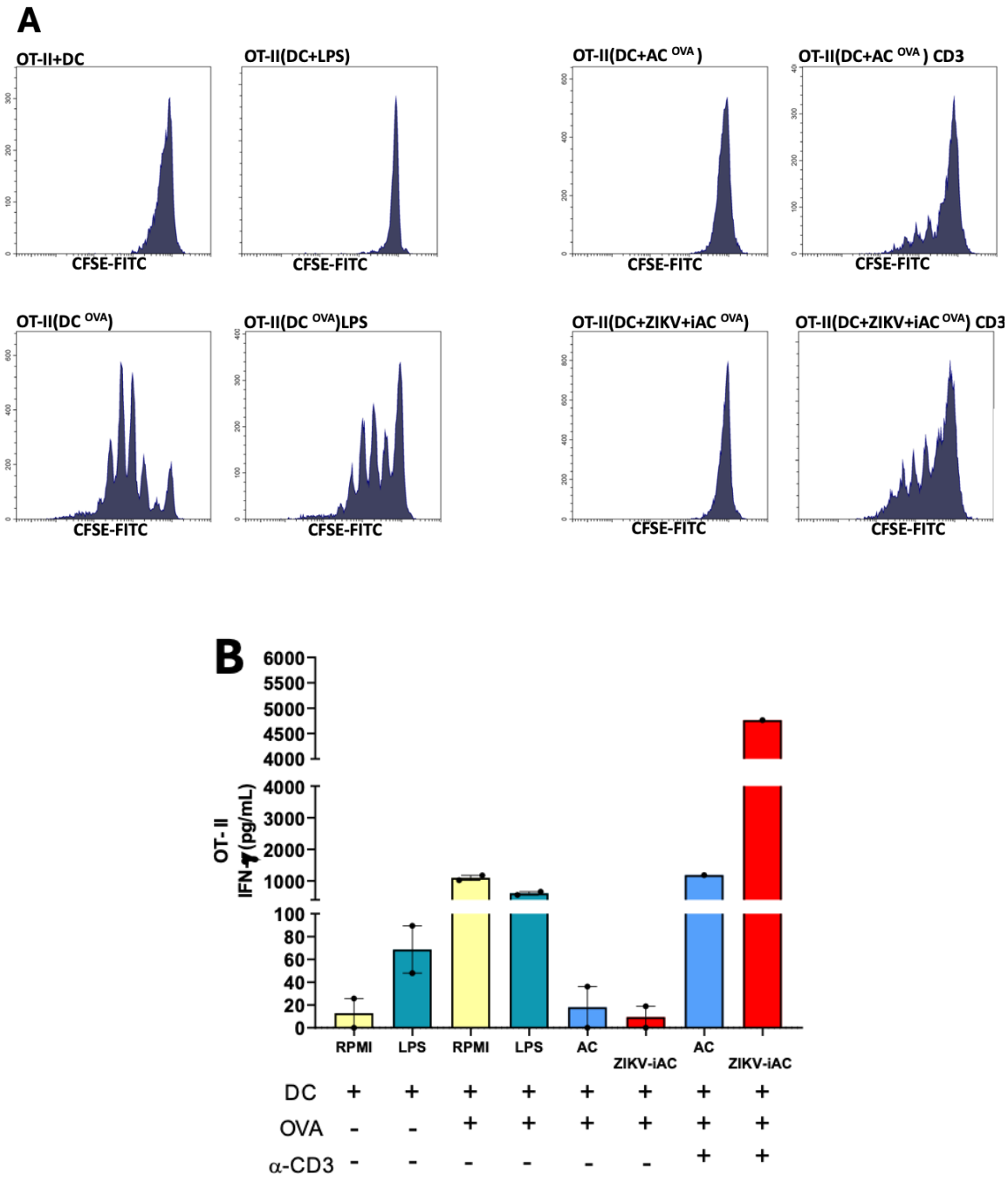
Para confirmar se a ausência de proliferação e produção de IFN-γ nessas condições era devido ao perfil tolerogênico de DCs mediante a eferocitose de ZIKV-iAC-OVA^+ e AC-OVA^+ foi adicionado a co-cultura anticorpos estimulantes anti-CD3. A presença de anti-CD3 foi hábil em restaurar a capacidade proliferativa, bem como a produção de IFN-γ por linfócitos OT-II, sugerindo que a eferocitose de ZIKV-iAC-OVA^+ e AC-OVA^+ levam a um perfil tolerogênico de DCs tornando-as, portanto, inábeis em induzir ativação de linfócitos OT-II.

Além disso, acrescentamos outros dois controles para validar se as DCs utilizadas nas culturas estavam funcionais e viáveis para induzir a ativação de linfócitos OT-II. BMDCs foram incubadas com OVA, e na presença ou ausência de LPS durante 1h, e então co-cultivadas com linfócitos OT-II, por 5 dias. DCs incubadas OVA, na presença ou ausência de LPS, foram hábeis em induzir a proliferação de linfócitos OT-II, bem como a produção de IFN-γ por esses linfócitos. No entanto, como esperado, DC incubadas apenas com meio de cultura ou LPS não interferem na proliferação celular, tão pouco na produção de IFN-γ.

Esses dados corroboram aos resultados apresentados previamente, demonstrando que os baixos índices de infecção por ZIKV em células apoptóticas (~35% de células apoptóticas contento ZIKV) durante o processo de eferocitose,

parece não ser suficiente em modificar o fenótipo de DC, tão pouco a produção de citocinas por essas células durante o processo de eferocitose de ZIKV-iAC-OVA^{+}. Mesmo obtendo uma alta porcentagem de eferocitose (~75%), vale destacar que a presença do ZIKV ocorreu em apenas ~35% das ZIKV-iAC, restando ainda ~60% de células não infectadas (AC) na co-cultura com a DC. Portanto, a predominância de AC não infectadas pode ter favorecido a geração de DCs tolerogênicas, incapazes de induzir a ativação de linfócitos TCD4^{+}OT-II, quando comparado as condições DC+OVA.

Figura 13. Ensaio de proliferação e ativação de linfócitos T OT-II cocultivados com DC+ZIKV-iAC.

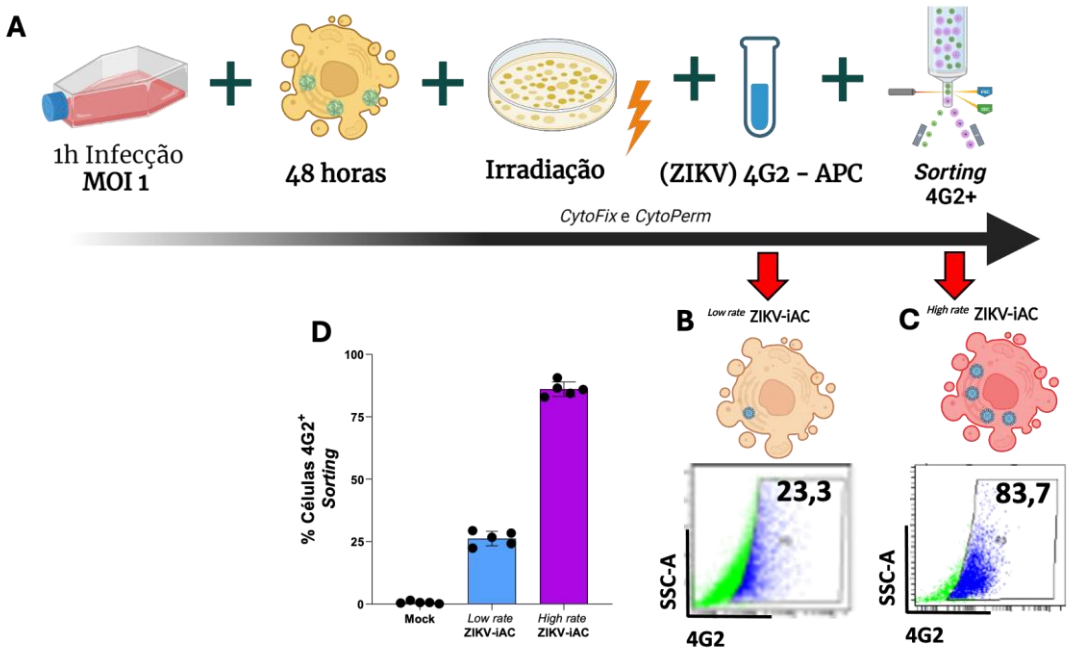


As células T CD4⁺ *naive* foram isoladas a partir de células do baço de camundongos OT-II e marcadas com CFSE para determinação da proliferação celular. As células AC e ZIKV-iAC foram conjugadas com OVA e co-cultivadas com BMDC durante 18h na proporção 1:3. Após esse período, as células não fagocitadas foram removidas da cultura e os linfócitos T CD4⁺ *naive* (OT-II) foram adicionados aos poços na proporção de 1 BMDC para 2 linfócitos T CD4⁺ (OT-II) cocultivados por período de 5 dias. Para validação do ensaio, BMDCs foram incorporadas diretamente com OVA, estimuladas com LPS durante 1h e cultivadas com linfócitos OT-II. Como controle positivo de proliferação, anticorpos anti-CD3 foram adicionados nas condições AC e ZIKV-iAC. Após 5 dias, os linfócitos foram coletados para determinação da proliferação celular por citometria de fluxo através da diluição de CFSE e o sobrenadante da cultura foi coletado para dosagem de IL-17A e IFN-γ. (A) Histograma representativo da proliferação celular nas diversas condições experimentais. (B) Gráfico em barras da quantificação da produção de IFN-γ após 120h de cultura. Resultado de um experimento individual realizado em duplicata experimental. Fonte: Autor

6.7. Enriquecimento da população de ZIKV-iAC e o impacto da eferocitose contendo alta taxa de ZIKV em células apoptóticas infectadas (*high rate* ZIKV-iAC)

Mediante aos dados inesperados obtidos a partir da co-cultura de BMDCs+ZIKV-iAC em relação ao fenótipo tolerogênico das DCs, a inabilidade do CM e das DCs em induzir a ativação e diferenciação de T $CD4^+$ *naive*, bem como de linfócitos OT-II, duas hipótese foram elaboradas: *i) a baixa taxa de infecção por ZIKV em células apoptóticas (denominado* $^{Low\ rate}$ *ZIKV-iAC) não seria suficiente para induzir a ativação de BMDCs durante a eferocitose*; *ii) a presença do vírus no interior das células apoptóticas utilizaria mecanismos de escapes para impedir a ativação de BMDCs durante a eferocitose*. Portanto, inicialmente tentamos investigar a hipótese *i*, avaliando se taxa de infecção por ZIKV nas células apoptóticas poderia ser uma variável crítica na ativação das BMDCs, posto que havia um grande número de AC não infectadas na condição ZIKV-iAC (~65%). Para tanto, realizamos o enriquecimento de ZIKV-iAC mediante a seleção de células positivas para 4G2-$FITC^+$, utilizando BD *FACSAria™ Cell Sorter*. As células foram previamente infectadas e, após 48h, foram irradiadas na intensidade de 5mJ para indução de apoptose celular. Após 18h da indução de apoptose, as células foram então coletadas, fixadas e marcadas com o anticorpo anti-4G2 (Figura 14). As células infectadas com ZIKV, ou seja, positivas para 4G2, foram selecionadas positivamente como demonstrado pela estratégia de *gate* estabelecida para detecção da infecção, conforme ilustrado na Figura 11A. Observou-se que a taxa de neuroblastomas infectados por ZIKV foi de 23%, ou seja, dentro da média da porcentagem de infecção obtida demonstrado previamente. Após a realização da seleção, alcançamos uma pureza de células infectadas por ZIKV (positivas para 4G2) de ~83%, como demonstrado na Figura 14C. Essa população purificada por *sorting* foi denominada $^{high\ rate}$ ZIKV-iAC.

Figura 14. Protocolo experimental para seleção de células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV por *Sorting*.



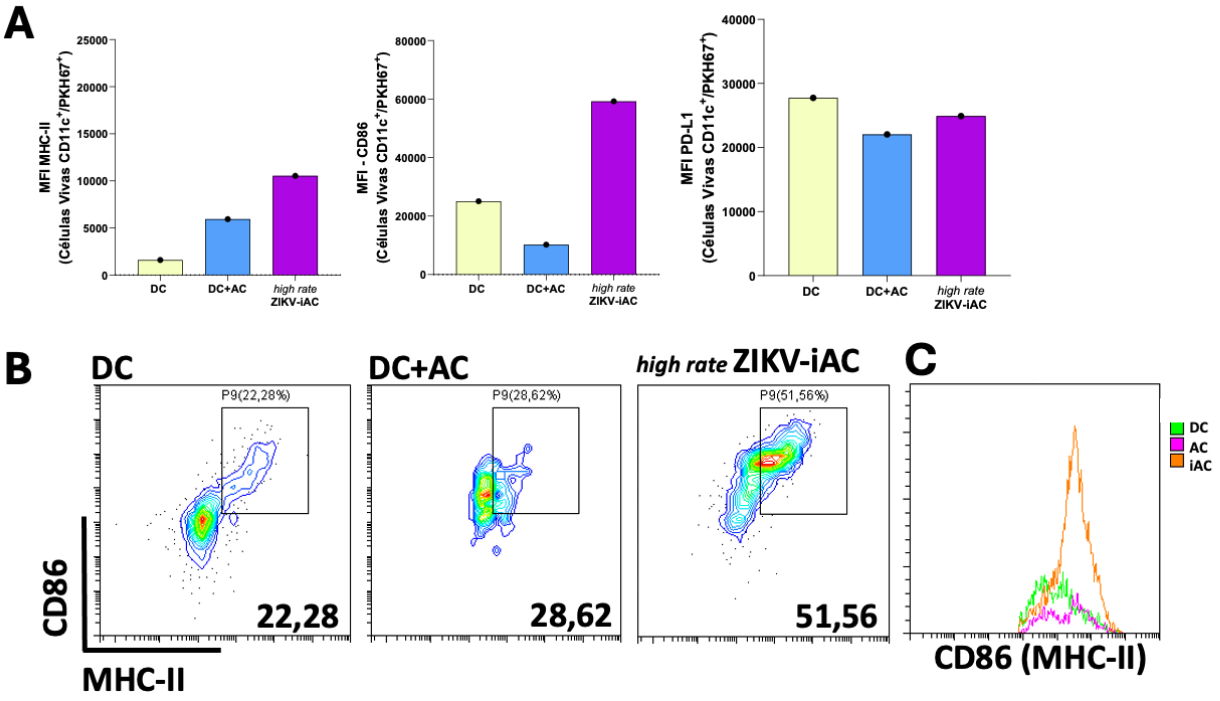
Células da linhagem SH-SY5Y foram submetidas à infecção com a cepa ZIKV PE243 por 48h (MOI de 1). Após 48h de infecção, as células foram irradiadas UVC (5mJ) e, após 18h, as células foram marcadas com anticorpo anti-4G2 para subsequente análise e isolamento das células 4G2-positivas utilizando *cell sorter*.

Após o isolamento por *sorting* a etapa subsequente consistiu em avaliar o perfil de ativação de BMDCs mediante a co-cultura com *high rate* ZIKV-iAC, mantendo a proporção de 1:3 (1BMDC: 3 *high rate* ZIKV-iAC). As BMDCs foram incubadas por 18h com ACs ou *high rate* ZIKV-iAC, e posteriormente a expressão de marcadores de ativação, como moléculas de CD86, MHC-II e PD-L1 (em termos de porcentagem e MFI), nas células $CD11c^+$ ou $CD11c^+/PKH67^+$ foi determinada por citometria de fluxo. Comprovando a hipótese *i* formulada, a co-cultura com *high rate* ZIKV-iAC foi capaz de induzir um robusto aumento do MFI de MHC-II, CD86, bem como a diminuição na expressão de PD-L1 em $CD11c^+PKH67^+$, em comparação com as condições com ACs ($CD11c^+PKH67^+$) ou BMDCs na ausência de eferocitose ($CD11c^+$) (Figura 15).

Para complementar os resultados até o momento obtidos, nós também quantificamos o perfil de citocinas produzido por DCs mediante a eferocitose de *high rate* ZIKV-iAC. Como descrito previamente, não houve diferenças estatisticamente significantes nos níveis de citocinas no sobrenadante das DCs

após a eferocitose de AC e *low rate* ZIKV-iAC, quando comparados as BMDCs na ausência de eferocitose. Entretanto, corroborando aos dados obtidos na citometria de fluxo, foi observado um expressivo aumento na produção de IL-10, IL-6 e IL-1β no microambiente estabelecido durante a eferocitose das células apoptóticas infectadas isoladas por *sorting*, ou seja, *high rate* ZIKV-iAC, quando comparado às condições de AC, *low rate* ZIKV-iAC e BMDCs. Tal alteração na composição do microambiente, aliada ao consequente aumento dos marcadores de ativação celular (aumento na porcentagem e MFI de MHC-II e CD86) (Figura 15), denota-se que as BMDCs estão adquirindo um distinto perfil inflamatório, com potencial capacidade de ativar os linfócitos T $CD4^+$, e induzir a diferenciação destes em subpopulações inflamatórias, a exemplo de Th1 ou Th17. É importante ressaltar que, até o presente momento, restringimos a apresentação de resultados oriundos de apenas um replicata biológica, porém, experimentos adicionais foram conduzidos e encontram-se em fase de análise. Além disso, ainda falta realizar a quantificação das citocinas TGF-β e TNF-α para a condição de co-cultura de DCs+*high rate* ZIKV-iAC, das células infectadas isoladas por *sorting*.

Figura 15. Fenótipo de BMDCs após eferocitose de células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV e isoladas por *sorting*.



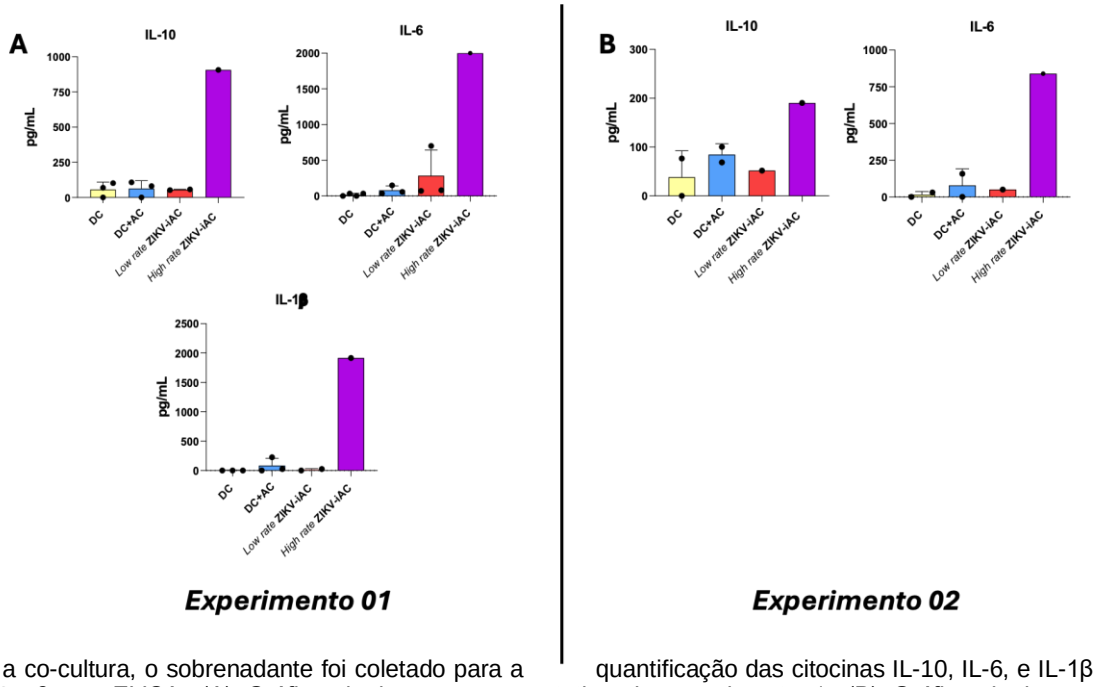
Células na presença de Mock e irradiadas com UVC (AC) e células infectadas, irradiadas com UVC e isoladas para cultura purificada de células infectadas (*high rate* ZIKV-iAC) foram previamente marcadas com PKH67 e co-cultivadas com BMDC na proporção de 1:3 por 18h. Após esse período, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo quanto a expressão dos marcadores CD86, MHC-II e PD-L1. (A) Gráfico de barras apresentando o MFI de células expressando moléculas de MHC-II, CD86 e PD-L1 na população viável de células $CD11c^{+}PKH67^{+}$. (B) Dot-plot representativo da porcentagem de células expressando moléculas de CD86 e MHC-II dentro da população de células $CD11c^{+}PKH^{+}$vivas. (C) Histograma representando o MFI de células expressando CD86 dentro da população viável $CD11c^{+}PKH67^{+}MHC\text{-}II^{+}$. Cada ponto representa um experimento independente. Fonte: Autor

Portanto, para complementar os resultados até o momento obtidos, nós também avaliamos por ELISA o perfil de citocinas presentes no sobrenadante da co-cultura decorridas 18h da eferocitose de AC, *low rate* ZIKV-iAC, ou *high rate* ZIKV-iAC. Como observado previamente, não houve diferenças estatisticamente significantes nos níveis de citocinas no sobrenadante das BMDCs após a eferocitose de AC e *low rate* ZIKV-iAC, quando comparados as BMDCs na ausência de eferocitose. Entretanto, corroborando aos dados do fenótipo imunoestimulador de DCs obtidos por citometria de fluxo, foi observado um expressivo aumento na produção de IL-10, IL-6 e IL-1β no sobrenadante da co-cultura de BMDCs na condição com *high rate* ZIKV-iAC, quando comparado às condições com AC, *low rate* ZIKV-iAC e BMDCs apenas. A replicata biológica desse experimento (experimento 2) demonstrou o mesmo perfil de ativação quanto a produção de IL-6 e IL-10, no

entanto, vale ressaltar que mediante ao baixo rendimento de *high rate* ZIKV-iAC nesse experimento, optamos por manter a razão 1DC:3 *high rate*ZIKV-iAC, porém utilizamos uma quantidade menor de BMDCs, razão pela qual, nestes experimentos, os níveis de citocinas foram inferiores ao experimento 1. Mediante a limitação de volume obtido no sobrenadante de cultura, e visto que não temos CBA para quantificação de citocinas em pequenas alíquotas, tivemos que priorizar a quantificação de apenas algumas citocinas. A presença das citocinas IL-6 e IL-1β, bem como o perfil imunogênico de BMDCs mediante ao aumento na expressão de MHC-II e CD86 (Figura 16), sugere que a eferocitose de *high rate* ZIKV-iAC por BMDCs possui potencial para ativar os linfócitos T $CD4^+$ a diferenciar-se em subpopulações inflamatórias, como Th1 ou Th17.

Estamos aumentando as replicatas biológicas tanto da determinação do fenótipo de BMDC na presença *high rate* ZIKV-iAC, paralelamente as outras condições experimentais, bem como a quantificação de citocinas para que possamos aplicar força estatística para validar nossa hipótese.

Figura 16. Perfil de citocinas produzido por BMDCs durante a eferocitose de *high rate* ZIKV-iAC e *low rate* ZIKV-iAC. Células apoptóticas não infectadas (AC) e infectadas isoladas (*high rate* ZIKV-iAC) ou não isoladas (*low rate* ZIKV-iAC) por *cell sorting.*

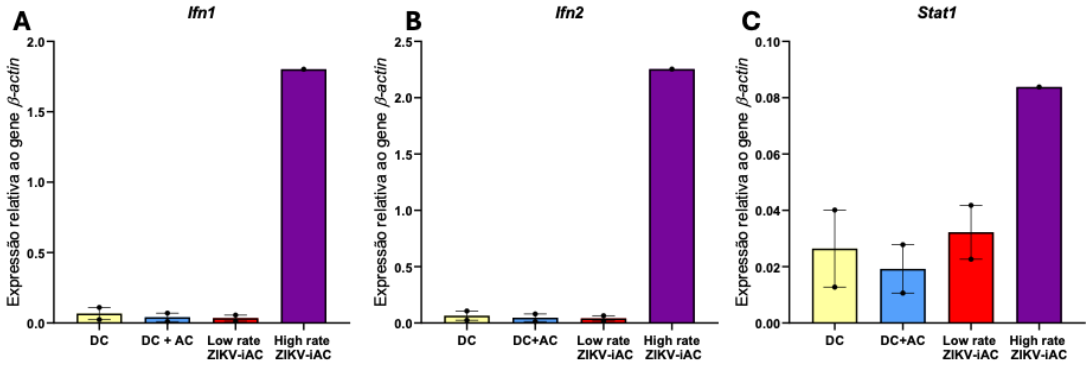


Após a co-cultura, o sobrenadante foi coletado para a quantificação das citocinas IL-10, IL-6, e IL-1β ou TGF-β por ELISA. (A) Gráfico de barras representativo do experimento 1. (B) Gráfico de barras representativo do experimento 2. Os dados são de dois experimentos independentes analisados separadamente. Fonte: Autor

6.8. Eferocitose de *high rate* ZIKV-iAC aumenta a expressão de genes regulados por IRF3/7 e NF-kB

Até o momento nada se tem descrito sobre a capacidade de componentes virais de ZIKV degradados durante o processo de eferocitose em interferir na ativação da cascata de ativação de genes regulados por IRF3/7. Para tanto, BMDCs foram incubadas na presença de AC, *low rate* ZIKV-iAC e *high rate* ZIKV-iAC na proporção de 1:3, por 18h. Após esse período, as células não fagocitadas foram removidas da co-cultura, e BMDCs foram avaliadas quanto à expressão do mRNA de *Ifn1*, *Ifn2*, *Stat1*. Cada símbolo no gráfico refere-se ao valor obtido de experimentos realizados de maneira individual (replicatas biológicas). Apenas a eferocitose de *high rate* ZIKV-iAC foi hábil em induzir a expressão de *Ifn1*, *Ifn2*, *Stat1*, quando comparado as condições *low rate* ZIKV-iAC, ou AC (Figura 17 A-C). Esses dados sugerem que apenas a eferocitose de majoritariamente células apoptóticas infectadas é capaz de induzir a expressão de genes regulados pelos fatores de transcrição IRF3/7.

Figura 17. Expressão de genes associados expressão de genes regulados por IRF3/7 e NF-kB.



As células na presença de Mock e irradiadas com UVC (AC) e infectadas isoladas (*high rate* ZIKV-iAC) ou não isoladas (*low rate* ZIKV-iAC) por cell sorting foram cocultivadas com BMDCs na proporção de 1:3 por 18h. Após esse período, as células não fagocitadas foram removidas da cultura e as BMDCs foram avaliadas quanto à expressão do mRNA de (A) *Ifn1*, (B) *Ifn2*, (C) *Stat1*. Cada símbolo no gráfico refere-se ao valor obtido de experimentos realizados de maneira individual (replicatas biológicas). Fonte: Autor

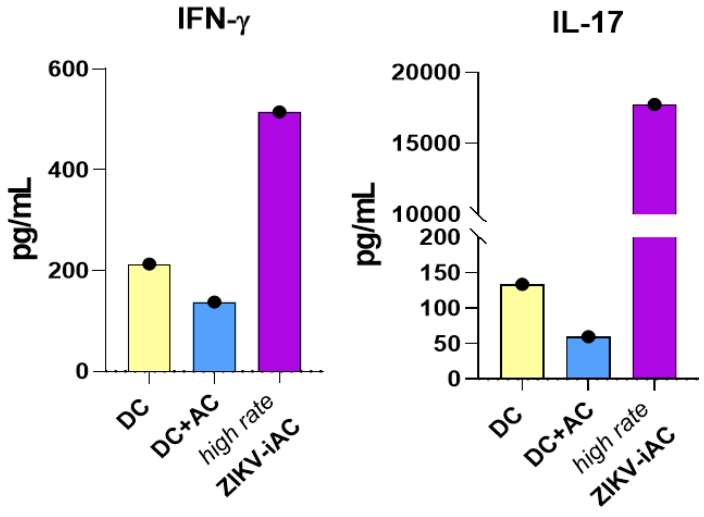
6.9. Perfil de diferenciação dos subtipos de células T CD4$^+$ na presença do CM oriundo da co-cultura de BMDCs+ *high rate* ZIKV-iAC

Com o objetivo de explorar o perfil de diferenciação de linfócitos T CD4$^+$ na presença das citocinas provenientes do microambiente gerado pela eferocitose de *high rate* ZIKV-iAC, células T CD4$^+$ *naive* foram isoladas do baço de camundongos C57BL/6, e estimuladas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, na presença do

meio condicionado (CM) oriundo das co-culturas das respectivas condições: BMDC, BMDC+AC, ou BMDC+ *high rate* ZIKV-iAC. Após três dias de diferenciação, o sobrenadante foi coletado para análise do perfil de citocinas por ELISA.

Os linfócitos cocultivados com o CM de BMDCs que eferocitaram *high rate* ZIKV-iAC foram hábeis em produzir elevados níveis de IL-17A em comparação a produção de IFN-γ, sugerindo uma possível diferenciação em linfócitos T CD4$^+$ de perfil Th17 (Figura 18). Com o objetivo de obter resultados mais conclusivos quanto a ativação de clones autorreativos, novos ensaios serão realizados utilizando o protocolo *in vitro*, mediante a eferocitose de BMDC+ *high rate* ZIKV-iAC+OVA e co-cultura com linfócitos obtidos de animais OT-II, como padronizado e demonstrado na Figura 10, utilizando *low rate* ZIKV-iAC.

Figura 18. Perfil de diferenciação de linfócitos T CD4+ cultivados na presença de Meio condicionado (CM) oriundo da eferocitose de *high rate* ZIKV-iAC.



Diferenciação de células T CD4$^+$ diferenciadas na presença do sobrenadante (CM) de BMDCs após a eferocitose de AC ou *high rate* ZIKV-iAC. Foi realizado a quantificação das citocinas IFN-γ e IL-17A no sobrenadante de células T CD4$^+$ por ELISA. Cada ponto representa um experimento independente. Fonte: Autor

7. DISCUSSÃO

O principal objetivo deste estudo foi investigar se a eferocitose de células apoptóticas infectadas por ZIKV seria hábil em promover a ativação de clones de células T autorreativas mediante a ativação por DCs. Nossos dados indicam que a taxa de infecção é uma variável crucial para a ativação de DCs. O fenótipo imunogênico nas DCs que eferocitaram *high rate* ZIKA-iAC, resultou do aumento da expressão de MHC-II e CD86, juntamente com a diminuição de PD-L1, moléculas essenciais para a interação entre DCs e células TCD4+. O microambiente de citocinas produzido pelas DCs também depende da taxa de infecção. Em altas taxas, detectamos a presença de IL-1β e TNF-α, diferentemente do microambiente em baixas taxas de infecção, que carece de citocinas inflamatórias. Além disso, nossos resultados demonstram que a eferocitose *low rate* ZIKV-iAC não foi eficiente em induzir a ativação de DC tão pouco a diferenciação de células T CD4+ em resposta ao microambiente oriundas de DCs durante a fagocitose de iAC. Corroborando esses achados, os ensaios funcionais com células T derivadas de camundongos OT-II mostraram ausência de ativação de células T na presença de antígenos apresentados pelas DCs que eferocitaram *low rate* ZIKV-iAC.

Para a condução de nossos experimentos, foi essencial a padronização da infecção de neuroblastomas da linhagem SH-SY5Y. O MOI é uma medida importante utilizada para descrever a razão entre o número de microrganismos infecciosos e o número de células alvo no início de um experimento infeccioso. Apesar de MOI de 0,1 ser considerada a proporção mais próxima de condições fisiológicas de infecção observadas *in vivo* (LIMA *et al.,*2019; SÁNCHEZ-SAN MARTÍN *et al.,*2018), nossos resultados demonstram que apenas o MOI igual ou superior a 1 foi capaz de estabelecer a infecção *in vitro* em células da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y, não apresentando diferenças na porcentagem de células infectadas em relação ao MOI 5 e 10. Os nossos dados corroboram aos prévios estudos utilizando a linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y à infecção por ZIKV, reforçando que o MOI de 1 e o período de 48 horas pós-infecção por ZIKV foi capaz de estabelecer a infecção em células SH-SY5Y (Alpuche-Lazcano *et*

*al.,*2018; Bonenfant *et al.,*2020; Braz-De-Melo *et al.,*2019; Lima *et al.,*2019; Sánchez-San Martín *et al.,*2018).

Estudos anteriores também indicaram que o ZIKV possui mecanismos de evasão da morte celular por apoptose, promovendo a elevação das proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-x, que são cruciais para a sobrevivência celular (T. Suzuki *et al.,*2018; Turpin *et al.,*2019). Nossos dados suportam essas descobertas, demonstrando que, pelo menos em condições *in vitro*, a infecção com ZIKV resulta em uma baixa porcentagem de células expressando caspase-3 clivada, uma proteína fundamental na execução da apoptose. No entanto, é crucial reconhecer que, apesar dessa resistência à apoptose, observada na linhagem celular avaliada em nossos experimentos, estudos prévios em modelos animais e em humanos têm mostrado que a infecção pelo ZIKV pode induzir uma expressiva morte celular, especialmente em células neurais primárias, levando a sérios danos neurológicos, como a microcefalia (Devhare *et al.,*2017; Martinot *et al.,*2019; Souza *et al.,*2016; Tang *et al.,*2017). Essas discrepâncias podem ser atribuídas às diferenças entre o uso de células imortalizadas em cultura *versus* células primárias, que possuem uma resposta mais próxima das condições fisiológicas. Portanto, é necessário validar nossos achados utilizando células neuronais primárias para obter um entendimento mais abrangente dos mecanismos de infecção e resposta celular ao ZIKV. Dessa forma, a irradiação com UV-C foi necessária para tentar aumentar a taxa de apoptose, visto que, em linhagens celulares de neuroblastoma, apenas o processo infeccioso não foi possível capaz de induzir uma taxa de morte celular como já descrito previamente tanto em estudos em humanos, como em células primárias (Aagaard *et al.,*2017; Retallack *et al.,*2016).

Quanto ao impacto da eferocitose na ativação de DCs, nossos resultados, demonstram que a eferocitose de ZIKA-iAC por BMDCs ou MoDCs não foi capaz de induzir a produção de IL-10, IL-6, TGF-β e TNF-α nas condições experimentais avaliadas. A análise da expressão de moléculas, como CD86 e MHC-II também não evidenciou qualquer modulação na porcentagem e MFI tanto em BMDcs quanto em MoDC. Corroborando os nossos dados, estudos prévios demonstram que a infecção por ZIKV em BMDC e MoDC não induz a modulação na expressão de CD80/86, CCR7 ou MHC-II, sugerindo um possível mecanismo de evasão e

inibição do processo de maturação de BMDC e MoDC pelo ZIKV (Bos *et al.,*2020; Vielle *et al.,*2018). Ainda, Park et al. (2020) demonstraram que as células dendríticas mieloides (mDCs) humanas são suscetíveis à infecção por ZIKV, que induz alterações na sinalização de interferon e de prolactina, decorrente da regulação negativa dos genes PIK3C3, JAK3, IRF1 e STAT3 após a infecção de mDCs por ZIKV (Park *et al.,*2020).

Diferente do observado, em outros modelos de infecção, foi evidenciado que durante o processo de degradação de corpos apoptóticos infectados, componentes bacterianos podem ativar DCs via receptores do tipo *Toll* no fagolisossomo (Magarian Blander*;* Medzhitov*,* 2006*;* Penteado *et al.,*2017). Em um estudo recente, foi demonstrado que células dendríticas, após a eferocitose de células apoptóticas infectadas por *Streptococcus pneumoniae*, estabelecem um microambiente inflamatório caracterizado pela presença de IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α (Niño-Castaño *et al.,*2022b). De forma semelhante, foi observado que a eferocitose de células apoptóticas infectadas por *Escherichia coli* resulta em um microambiente que promove a maior produção de IL-1β, IL-6 e prostaglandina E_2 (PGE_2), um mediador lipídico envolvido em processos de inflamação e dor (Penteado *et al.,*2017). A presença diferenciada de PGE_2 nas infecções por *E. coli* indica uma variação na resposta inflamatória em comparação com *S. pneumoniae*.

Considerando que as células ZIKA-iAC contêm componentes virais em seu interior, nossa hipótese era que esses PAMPs seriam reconhecidos pelos receptores PRR presentes no fagolisossomo. Nesse contexto, três receptores se destacam no reconhecimento do ssRNA do ZIKV: TLRs-3, 7 e 8 (KOYAMA *et al.,*2008; NAZMI *et al.,*2014). Estudos demonstraram que a infecção por ZIKV aumenta a expressão de TLR3 em astrócitos humanos primários, e essa elevação está associada a uma maior susceptibilidade à infecção pelo ZIKV e à severidade da doença (OJHA *et al.,*2019; WANG *et al.,*2004). Esse fenômeno não é exclusivo ao ZIKV; ele também foi observado em infecções por outros vírus, como o vírus da dengue (DENV), o vírus do Nilo Ocidental (WNV), o vírus da gripe A, HIV e o vírus Herpes simplex, onde a regulação de TLR3 está correlacionada com a gravidade da doença (Reinert *et al.,*2012; Tsai *et al.,*2009; T. Wang *et al.,*2004).

No entanto, ao contrário do que se observa em infecções bacterianas, a presença de ZIKV dentro das células apoptóticas não induziu a maturação das

DCs. Isso sugere que a resposta imune inata ao ZIKV pode ser diferente daquela observada com patógenos bacterianos, possivelmente devido a diferenças nos PAMPs reconhecidos ou na capacidade do ZIKV de modular a resposta imune. Esse fenômeno reforça a ideia de que a variação nos perfis de citocinas e nos marcadores de ativação observada após a eferocitose de células infectadas por diferentes patógenos depende da natureza do microrganismo, que influencia a direção da resposta inflamatória mediada por células dendríticas.

Além de um possível mecanismo de evasão já previamente descrito na literatura em BMDCs (Bos *et al.,*2020; Vielle *et al.,*2018), a outra hipótese levantada seria que os ensaios de co-cultura foram conduzidos com uma predominância de células apoptóticas não infectadas (~60%), juntamente com células infectadas com ZIKV (~30-35%) ($^{low\ rate}$ ZIKV-iAC). Portanto, umas das justificativas para a observação de um perfil tolerogênico das células dendríticas durante a eferocitose, seria a presença de uma baixa frequência de células apoptóticas contendo o vírus no seu interior, uma vez que outros estudos evidenciaram que a eferocitose de células tumorais na ausência de PAMPs, conduz células dendríticas a adquirirem um perfil tolerogênico (Crittenden *et al.,*2016; Y. Wang *et al.,*2013), como pode ser evidenciado pela ausência de modulação na expressão de MHC-II e CD86, e pelo aumento de PD-L1. Nestes casos o microambiente resultante é caracterizado pela predominância de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF-β.

Considerando que células dendríticas funcionais precisam expressar MHC-II e CD86 para ativar células T CD4$^+$, hipotetizamos que a eferocitose de células $^{high\ rate}$ ZIKA-iAC, como mostrado na Figura 12, seria capaz de induzir a ativação de BMDCs e potencialmente ativar linfócitos T CD4$^+$. Esta ativação seria crucial para a indução e proliferação de clones autorreativos. No entanto, estamos enfrentando uma limitação significativa em nossos experimentos devido ao baixo rendimento de células $^{high\ rate}$ ZIKA-iAC após o isolamento. Apesar de termos realizado cinco replicatas biológicas de *sorter* de $^{high\ rate}$ZIKA-iAC, o número de células obtido ao final do procedimento inviabiliza a realização de experimentos subsequentes de imunofenotipagem, quantificação de citocinas e diferenciação de linfócitos T CD4$^+$. Até o momento, conseguimos realizar apenas duas replicatas

biológicas para testar nossa hipótese, e em uma delas, houve um problema técnico com o equipamento, resultando na perda dos dados experimentais.

Após o enriquecimento da população *high rate* ZIKA-iAC, alcançamos aproximadamente 86% de células apoptóticas infectadas pelo ZIKV (*high rate* ZIKA-iAC). Observamos que, ao contrário do que foi observado na co-cultura com uma baixa porcentagem de ZIKV-iAC (~35%), as células dendríticas que eferocitaram *high rate* ZIKA-iAC adquiriram um perfil de maturação imunogênico, com aumento significativo de MHC-II e CD86, tanto em termos de porcentagem quanto de intensidade de fluorescência, além de uma redução na expressão de PD-L1. Diferentemente do observado para *low rate* ZIKV-iAC, a eferocitose de *high rate* ZIKA-iAC estabeleceu um microambiente inflamatório com a detecção de IL-6 e IL-1β. O aumento no número de neuroblastomas infectados pelo ZIKV após o enriquecimento por *sorting* foi determinante para a modulação dos marcadores de ativação de BMDCs. Os resultados do ensaio de co-cultura indicam que a taxa de infecção na presença dos PAMPs-ZIKV desempenha um papel crucial no estabelecimento de um microambiente inflamatório (Brereton*;* Blander, 2011b; Torchinsky *et al.,*2009b).

Células T CD4$^+$ *naive* cultivadas na presença de meio condicionado oriundo de BMDCs que eferocitaram *low rate* ZIKV-iAC, não apresentaram um perfil de diferenciação diferente do observado na condição contendo apenas meio de cultura e anti-CD3/anti-CD28. Este resultado corrobora ao observado quanto ao perfil de ativação de DCs após a eferocitose de *low rate* ZIKV-iAC, ou seja, não houve alteração quanto ao perfil de mediadores solúveis, como IL-1β, IL-6, TGF-β que se sustenta um microambiente que leve a diferenciação de subpopulações de T CD4+ em Th. Por outro lado, células T CD4$^+$ *naive* cultivadas com o meio condicionado oriundo de células dendríticas fagocitaram *high rate* ZIKA-iAC sugerem um perfil de diferenciação de linfócitos Th17, com uma robusta produção IL-17A e IFN-γ, comparado as demais condições experimentais. É importante notar que presença de linfócitos Th1 e Th17 já foi previamente correlacionada a várias neuropatias associadas a infecções virais. Estudos indicam que pacientes diagnosticados com síndrome de Guillain-Barré (SGB) após infecção pelo ZIKV apresentam níveis elevados de citocinas, como IL-6, IL-8, IL-1ra, IL-17 e IL-22, além de subpopulações de células Th1, Th2, Th9 e Th17 (Li *et al.,*2014; X. Wu *et*

*al.,*2016). Esses achados sugerem que a resposta imune associada ao ZIKV pode induzir um perfil de citocinas pró-inflamatórias e uma ativação robusta de diferentes subpopulações de células T, o que contribui para a complexidade e gravidade das manifestações clínicas observadas em infecções por ZIKV.

As células Th17 se diferenciam em um microambiente rico em citocinas como IL-6, IL-1β e TGF-β (Hirota *et al.,*2013). Coomes e Haghbayan (2020) demonstraram que pacientes com COVID-19 grave apresentam níveis circulantes de IL-6 quase três vezes superiores aos encontrados em casos leves (Coomes*;* Haghbayan, 2020). O bloqueio da IL-6 com um antagonista de seu receptor resultou em melhoras significativas no prognóstico dos pacientes. A IL-6 desempenha um papel crucial na indução da diferenciação de células Th17. Adicionalmente, a IL-17 estimula a secreção de IL-6, estabelecendo um ciclo de retroalimentação que pode amplificar a resposta inflamatória (Coomes*;* Haghbayan, 2020). Wang et al. demonstraram que camundongos deficientes em IL-17 exibiram maior suscetibilidade à infecção pelo vírus influenza H5N1 e apresentaram taxas de mortalidade mais elevadas em comparação com camundongos do tipo selvagem (X. Wang *et al.,*2011). De forma similar, camundongos *il17*$^{-/-}$ infectados com o vírus influenza H1N1 mostraram uma taxa de sobrevivência significativamente reduzida. A ausência de IL-17, compromete a capacidade dos camundongos de montar uma defesa eficaz contra a infecção. A resposta protetora observada nestes camundongos foi correlacionada com uma forte resposta de células Th17, juntamente com uma resposta robusta de células Th1 (McKinstry *et al.,*2009; X. Wang *et al.,*2011). Durante o período de maior atividade da infecção, houve um aumento substancial na expressão de várias citocinas associadas à resposta Th17 nos pulmões desses animais (Paiva *et al.,*2021).

Um estudo investigou indivíduos assintomáticos infectados por DENG e ZIKV, observando níveis elevados de IL-17 em todos os pacientes em comparação com indivíduos saudáveis (Tappe *et al.,*2016b). Durante a fase inicial da infecção por ZIKV, Naveca et al. monitoraram diariamente o perfil de citocinas, revelando que os níveis de IL-17, IL-1β e IL-6 acompanharam os picos de viremia (Naveca *et al.,*2018). Até agora, há poucos estudos explorando o papel da IL-17 em arbovírus e o impacto das células Th17 em pacientes infectados, o que ainda

é uma questão em aberto quanto ao seu potencial protetor ou patogênico durante o curso da doença. No entanto, alguns estudos indicam uma forte correlação entre o perfil de citocinas e o desenvolvimento de autoimunidade em pacientes infectados pelo ZIKV (LI *et al.,*2014; WU *et al.,*2016).

A inflamação mediada por células Th17 pode intensificar a imunopatologia e agravar o dano tecidual em doenças como miocardite viral (C. Huang *et al.,*2020; Xu *et al.,*2020). As células Th17 já foram descritas como as principais células efetoras em várias doenças autoimunes, como esclerose múltipla, psoríase, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (Flannigan *et al.,*2017; Korn *et al.,*2009; Patel*;* Kuchroo, 2015; Yang *et al.,*2014). Dentre esses exemplos, destaca-se a esclerose múltipla, uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central. Nesse contexto, as células Th17 desempenham um papel crucial no desenvolvimento da doença. Essas células produzem IL-17 e IFN-γ, sendo, portanto, consideradas células Th17 patogênicas. O microambiente necessário para a diferenciação dessas células é composto por IL-1β, TGF-β e IL-23 (Cao *et al.,*2015; Knochelmann *et al.,*2018; B. Wu*;* Wan, 2020). A análise dos soros e do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide revelou um aumento de IL-17, bem como um aumento da expressão de mRNA de IL-17A, indicando a gravidade na progressão da doença (Sarkar*;* Fox*,* 2010). O lúpus eritematoso sistêmico afeta diversos órgãos, como a pele, articulações e o sistema nervoso central. Vários subtipos de células imunes estão desregulados durante o curso da doença, com destaque para células B e células T (Tsokos, 2011), autoanticorpos já foram descritos em pacientes com lúpus. A produção desses autoanticorpos resulta das interações entre células T e células B, sendo a co-estimulação um fator crucial nesse processo (Blair *et al.,*2010; Renaudineau *et al.,*2004). Estudos em humanos e modelos murinos demonstraram que as células Th17 estão intimamente envolvidas no desencadeamento da doença. A quantificação de IL-17 no soro dos pacientes está elevada em comparação com indivíduos saudáveis (Mok *et al.,*2010; C. K. Wong *et al.,*2008). Além disso, vários estudos mostram uma correlação significativa entre os níveis de IL-17 e o prognóstico grave da doença (Dolff *et al.,*2010, 2011, 2014; Shah *et al.,*2010).

O nosso próximo passo foi explorar uma possível ativação de células T $CD4^+$ autorreativas. Portando, inicialmente, conduzimos a co-cultura na presença

de *low rate* ZIKV-iAC-OVA$^+$ com BMDCs. Após 18 horas, adicionamos linfócitos T CD4$^+$ derivados de camundongos OT-II, os quais foram mantidos em cultura com BMDCs por 5 dias. Conforme esperado com base em resultados prévios, notamos que as BMDCs que eferocitaram *low rate* ZIKV-iAC-OVA$^+$ não foram capazes de ativar os linfócitos T CD4$^+$ OT-II, sugerindo que a taxa de infecção (~30-40%) não é suficiente para desencadear a ativação de células T CD4$^+$ autorreativas. Um estudo utilizando animais transgênicos que expressam OVA nas células demonstrou que a transferência de células T CD4$^+$ de animais OT-II para animais infectados com *C. rodentium* resulta na ativação de clones autorreativos. A inibição da apoptose das células, utilizando um inibidor de pan-caspase, resultou em uma redução significativa no número de células Th17 em comparação com os animais infectados na ausência do inibidor de apoptose (Campisi *et al.,*2016). Campisi *et al.,*demonstraram que a eferocitose de iACs promove a apresentação de antígenos próprios. Esse fenômeno, quando associado ao microambiente inflamatório e às predisposições genéticas do hospedeiro, pode desencadear a ativação de células T autorreativas e o desenvolvimento de autoimunidades.No entanto, devido às limitações na obtenção de um alto rendimento de células *high rate* ZIKV-iAC após o isolamento, não foi possível realizar o experimento de ativação de linfócitos OT-II mediante a eferocitose de *high rate* ZIKV-iAC.

A próxima etapa consistiu na análise da expressão gênica de genes regulados por IRF3/7 e NF-κB. Para isso, realizamos a PCR em tempo real, o que eliminou a necessidade de utilizar um número elevado de células nos ensaios *in vitro*. Desta forma, conseguimos analisar a expressão de genes regulados por IRF3/7 e NF-kB, sendo que as DCs que eferocitaram *high rate* ZIKV-iAC apresentaram aumento significativo na expressão de *Ifn1*, *Ifn2* e *Stat1*. A infecção viral pode ativar as proteínas quinases TBK1 e IKKε, que fosforilam os fatores de transcrição IRF3/7, enquanto a proteína quinase IKKε ativa o fator de transcrição NF-kB que resulta na expressão de interferons dos tipo I, como o IFN-β (Bowen; *et al.,*2019; Mcnab *et al.,*2020). No entanto, prévios estudos demonstram que o ZIKV possui mecanismos de evasão da resposta imunológica, tais como, estratégias de mascaramento do RNA genômico livre no citosol e inibição da ativação da cascata de sinalização via IFNs, etapa importante como sinal de alerta para a infecção (Estévez-Herrera *et al.,*2021).

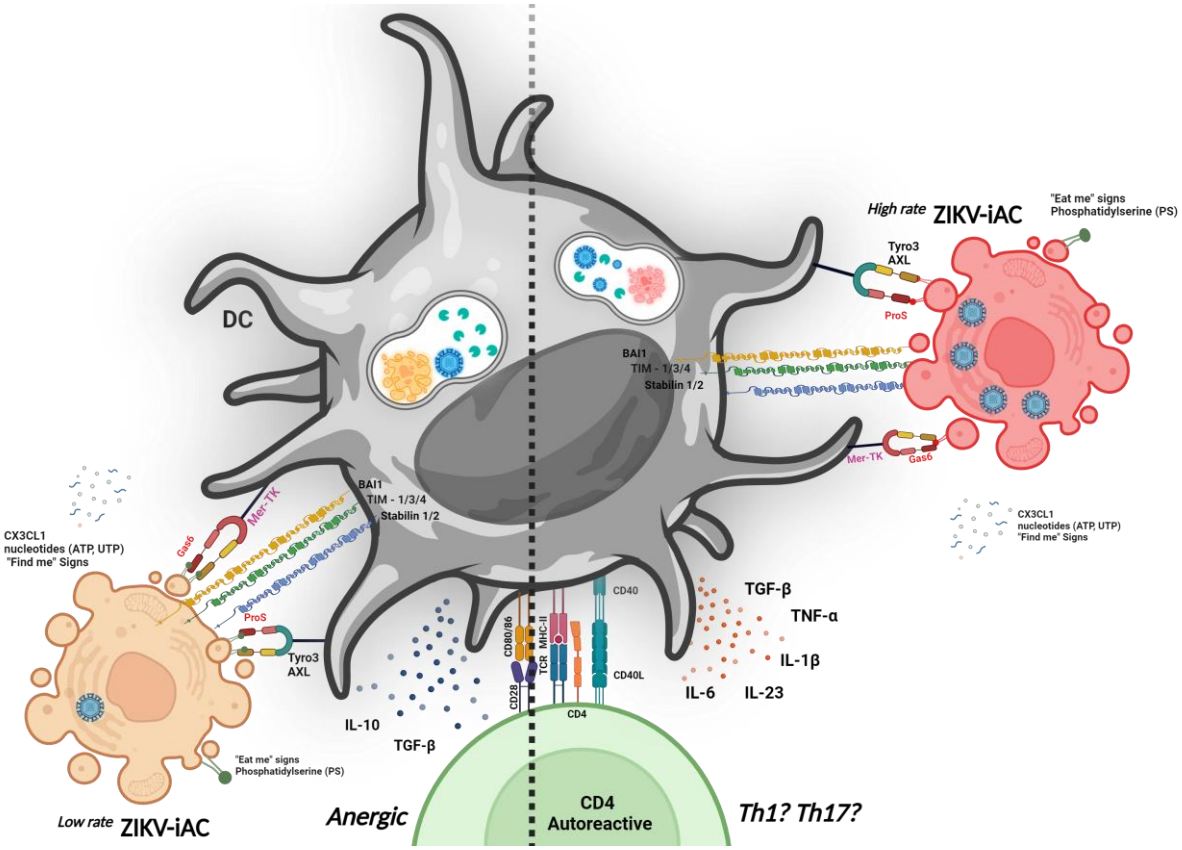
O conjunto de nossos resultados sugerem que a taxa de infecção parece ser determinante na indução da maturação de células dendríticas com um fenótipo imunogênico. Esta maturação parece ser fundamental para criar um microambiente que favorece a ativação de células T $CD4^+$ e diferenciação de Th17 produtores de IFN-γ e IL-17. Especificamente, essencial investigar uma possível correlação com altas taxas de infecção por ZIKV, como nas condições *high rate* ZIKV-iAC, e uma possível ativação de células T $CD4^+$ autorreativas. Entender este mecanismo pode esclarecer a conexão com o desenvolvimento de doenças autoimunes ou neuroimunopatologias, conforme observado previamente com infecções por enterobactérias. A compreensão detalhada desse processo é crucial, uma vez que um ambiente propício pode não apenas intensificar a resposta imune, mas também influenciar significativamente o curso e a gravidade da doença associada ao ZIKV.

8. CONCLUSÕES

- A taxa de infecção foi avaliada em diferentes *time-point*, e a maior taxa de infecção foi obtida após 48h, utilizando o MOI de 1 (~40% das células infectadas, anti-4G2+). A infecção por ZIKV vírus na linhagem de neuroblastoma não foi capaz de induzir uma robusta apoptose celular, no entanto, a radiação UV-C após a infecção por ZIKV resultou ~30% de células positivas para caspase 3-clivada.
- A baixa taxa de infecção ZIKV no interior da célula apoptótica (*low rate* ZIKV-iAC) não resultou em diferenças significativas na expressão de marcadores de ativação celular em DCs, como CD86, MHC-II e PD-L1, tampouco a produção de citocinas, como IL-6, TNF-α, IL-10 ou TGF-β, quando comparado à eferocitose de células apoptóticas não infectadas (DC+AC).
- O perfil tolerogênico de DCs mediante a eferocitose de *low rate* ZIKV-iAC foi confirmado utilizando o ensaio de cocultura na presença de linfócitos T CD4+ OT-II. A eferocitose de *low rate* ZIKV-iAC/OVA e AC/OVA por DCs não foi capaz de induzir a proliferação de linfócitos T CD4+ OT-II, ou a produção de IFN-γ ou IL-17, sugerindo a aquisição de um perfil tolerogênico de DCs durante a eferocitose nesse contexto.

- O enriquecimento da população de células apoptóticas infectadas com ZIKV (*high rate* ZIKV-iAC) por *sorting* resultou em uma pureza de ~83% de células 4G2-FITC+. Os resultados preliminares sugerem que a eferocitose de *high rate* ZIKV-iAC resultou em um aumento significativo na expressão de MHC-II e CD86 e diminuição de PD-L1 em DCs, e aumento na produção de IL-10, IL-6 e IL-1β, sugerindo um perfil fenotípico inflamatório mediante a eferocitose de uma alta porcentagem de ZIKV-iAC.
- A eferocitose de *high rate* ZIKV-iAC por DCs parece impactar na expressão de genes associados a produção de IFN-tipo I e II, sugerindo um aumento na expressão de *Ifn1, Ifn2, Stat1,* quando comparado as condições DC, DC+ AC ou *low rate* ZIKV-iAC.
- Os resultados de diferenciação de linfócitos T CD4+ cocultivados com sobrenadante (meio condicionado – CM) obtido da condição DC+ *high rate* ZIKV-iAC sugerem um perfil diferenciação de Th17, visto que os níveis de IL-17 são superiores ao de IFN-γ.

9. CONCLUSÃO FINAL



Nossos resultados demonstram que a eferocitose de células apoptóticas contendo uma baixa taxa de infecção por ZIKV não é capaz de ativar o perfil imunogênicos em DCs tampouco a proliferação e ativação de clones autorreativos, como demonstrado pelos ensaios utilizando linfócitos obtidos de animais OT-II. No entanto, os experimentos utilizando a eferocitose de *high rate* ZIKV-iAC, que não fazia parte da nossa hipótese inicial, serão fundamentais para confirmarmos uma possível ativação de linfócitos T CD4+ autorreativos, mimetizando uma infeção com altos títulos virais. Esses resultados sugerem que a eferocitose de uma baixa porcentagem de AC contento o ZIKV, ou uma baixa taxa de infecção, não é suficiente em ativar vias sinalização que permitem a ativação de DCs e consequentemente ativação e diferenciação de linfócitos TCD4+. Dessa maneira, a taxa de infecção nas células apoptóticas parece ser determinante para que a eferocitose possa impactar a ativação de DCs e de clones autorreativos que poderiam favorecer o desenvolvimento doenças autoimunes, como já demonstrado em infecções por enterobactérias.

10. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

CEUA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP

C E RT I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **"AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS POR MEIO DA EFEROCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS INFECTADAS POR ZIKA VÍRUS"**, registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 26/2021, sob a responsabilidade do pesquisador Breno Vilas Boas Raimundo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado "ad referendum" pelo Vice-coordenador da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP no dia 12 de janeiro de 2022.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Novembro de 2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	30
Peso/Idade	20g / 6 a 8 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério central FMRP-USP Ribeirão Preto ou Biotério de Botucatu (CPPA)
Registro CIAEP	02.00082.2019

Araraquara, 12 de janeiro de 2022.

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
Vice-coordenador da CEUA

REFERÊNCIAS

AAGAARD, K. M. et al. Primary Human Placental Trophoblasts are Permissive for Zika Virus (ZIKV) Replication. **Scientific Reports**, v. 7, n. August 2016, p. 1–14, 2017.

ALBERT, M. L.; SAUTER, B.; BHARDWAJ, N. Dendritic cells acquireantigen fromapoptoticcellsandinduce class I-restricted CTLs. **Nature**, v. 392, n. March, p. 86–89, 1998.

ALPUCHE-LAZCANO, S. P. et al. Higher cytopathic effects of a zika virus brazilian isolate from bahia compared to a Canadian-imported thai strain. **Viruses**, v. 10, n. 2, 1 fev. 2018.

ANFASA, F. et al. Zika virus infection induces elevation of tissue factor production and apoptosis on human umbilical vein endothelial cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, 2019.

ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 3–4, p. 325–331, 2008.

ASHKENAZI, A.; SALVESEN, G. Regulated cell death: signaling and mechanisms. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, p. 337–356, 2014.

BIANCONI, E. et al. An estimation of the number of cells in the human body. **Annals of Human Biology**, v. 40, n. 6, p. 463–471, 2013.

BLACHÈRE, N. E.; DARNELL, R. B.; ALBERT, M. L. Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation. **PLoS Biology**, v. 3, n. 6, p. 1070–1078, 2005.

BLAIR, P. A. et al. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. **Immunity**, v. 32, n. 1, p. 129–140, 29 jan. 2010.

BOADA-ROMERO, E. et al. Mechanisms and physiology of the clearance of dead cells by efferocytosis. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 21, n. 7, p. 398–414, 2020.

BONENFANT, G. et al. Asian zika virus isolate significantly changes the transcriptional profile and alternative RNA splicing events in a neuroblastoma cell line. **Viruses**, v. 12, n. 5, 1 maio 2020.

BOS, S. et al. Zika Virus Inhibits IFN-α Response by Human Plasmacytoid Dendritic Cells and Induces NS1-Dependent Triggering of CD303 (BDCA-2) Signaling. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 28 out. 2020.

BOWEN, J. R.; ZIMMERMAN, M. G.; SUTHAR, M. S. Taking the Defensive: Immune Control of Zika Virus Infection. **Physiology; behavior**, v. 63, n. 8, p. 1–18, 2019.

BRAZ-DE-MELO, H. A. et al. Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

BRERETON, C. F.; BLANDER, J. M. The unexpected link between infection-induced apoptosis and a T h 17 immune response . **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 4, p. 565–576, 19 jan. 2011a.

BRERETON, C. F.; BLANDER, J. M. The unexpected link between infection-induced apoptosis and a TH17 immune response. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 4, p. 565–576, 1 abr. 2011b.

CABEZA-CABRERIZO, M. et al. Annual Review of Immunology Dendritic Cells Revisited. **Immunology**, v. 39, p. 131–166, 2021.

CAMPISI, L. et al. Apoptosis in response to microbial infection induces autoreactive T H17 cells. **Nature Immunology**, v. 17, n. 9, p. 1084–1092, 2016.

CAO, Y. et al. Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 287, 13 maio 2015.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia. **Lancet**, v. 387, n. 10027, 2016.

CHAWLA-SARKAR, M. et al. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. **Apoptosis**, v. 8, n. 3, p. 237–249, 2003.

CHEN, J. et al. Zika virus infects renal proximal tubular epithelial cells with prolonged persistency and cytopathic effects. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 1, 2017.

CHEN, J. C. et al. Infection of human uterine fibroblasts by Zika virus in vitro: implications for viral transmission in women. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 51, p. 139–140, 2016.

COLDBECK-SHACKLEY, R. C.; EYRE, N. S.; BEARD, M. R. The molecular interactions of zikv and denv with the type-i IFN response. **Vaccines**, v. 8, n. 3, p. 1–21, 1 set. 2020.

COOMES, E. A.; HAGHBAYAN, H. Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. **Reviews in Medical Virology**, v. 30, n. 6, p. 1–9, 1 nov. 2020.

CRITTENDEN, M. R. et al. Mertk on tumor macrophages is a therapeutic target to prevent tumor recurrence following radiation therapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 48, p. 78653–78665, 2016.

CROUSE, J.; KALINKE, U.; OXENIUS, A. Regulation of antiviral T cell responses by type i interferons. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 4, p. 231–242, 2015.

DAI, L. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696–704, 2016.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019.

DEJANI, N. N. et al. Intestinal host defense outcome is dictated by PGE2 production during efferocytosis of infected cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 36, p. E8469–E8478, 4 set. 2018.

DEN HAAN, J. M. M.; LEHAR, S. M.; BEVAN, M. J. CD8 but Not CD8 Dendritic Cells Cross-prime Cytotoxic T Cells In Vivo. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 1685–1695, 2000.

DEVHARE, P. et al. Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 10, p. 1–8, 2017.

DOLFF, S. et al. Increased expression of costimulatory markers CD134 and CD80 on interleukin-17 producing T cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research and Therapy**, v. 12, n. 4, 23 jul. 2010.

DOLFF, S. et al. Disturbed Th1, Th2, Th17 and T reg balance in patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical Immunology**, v. 141, n. 2, p. 197–204, nov. 2011.

DOLFF, S.; ABDULAHAD, W. H.; KALLENBERG, C. G. M. Response to "T-helper 17 cell cytokines and interferon type I: Partners in crime in systemic lupus erythematosus?" **Arthritis Research and Therapy**, v. 16, n. 3, 9 jun. 2014.

DONALD, C. L. et al. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1–20, 2016.

DORAN, A. C.; ARIF, Y.; TABAS, I. Efferocytosis in health and disease. **Physiology*;* behavior**, v. 176, n. 5, p. 139–148, 2021.

ELLIOTT, M. R. et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal for phogocytic clearence. **Nature**, v. 461, n. 7261, p. 282–286, 2009.

ESPADA, C. E. et al. ISG15/USP18/STAT2 is a molecular hub regulating IFN I-mediated control of Dengue and Zika virus replication. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 2024.

ESTÉVEZ-HERRERA, J. et al. Zika virus pathogenesis: A battle for immune evasion. **Vaccines**, v. 9, n. 3, p. 1–30, 2021.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D. et al. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318–328, 2009.

FLANNIGAN, K. L. et al. IL-17A-mediated neutrophil recruitment limits expansion of segmented filamentous bacteria. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 3, p. 673–684, 1 maio 2017.

FRUMENCE, E. et al. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN-β production and apoptosis induction. **Virology**, v. 493, p. 217–226, 1 jun. 2016.

FUJII, T. et al. TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 41, p. 12800–12805, 13 out. 2015.

GALLIEZ, R. M. et al. Zika virus causing encephalomyelitis associated with immunoactivation. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, 1 out. 2016.

GENG, K. et al. Requirement of gamma-carboxyglutamic acid modification and phosphatidylserine binding for the activation of Tyro3, Axl, and Mertk receptors by growth arrest-specific 6. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, 2017.

GENTILE, M.; LATONEN, L.; LAIHO, M. Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 16, p. 4779–4790, 15 ago. 2003.

GUIMARÃES-PINTO, K. et al. Differential regulation of lung homeostasis and silicosis by the TAM receptors MerTk and Axl. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 2024.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.

HAN, R. K. et al. Increased circulating Th17 cell populations and elevated CSF osteopontin and il-17 concentrations in patients with Guillain-Barré syndrome. **Journal of Clinical Immunology**, v. 34, n. 1, p. 94–103, jan. 2014.

HIROTA, K. et al. Plasticity of TH 17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. **Nature Immunology**, v. 14, n. 4, p. 372–379, abr. 2013.

HONDA, K.; TANIGUCHI, T. IRFs: Master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 9, p. 644–658, 2006.

HOU, W. et al. Determination of the Cell Permissiveness Spectrum, Mode of RNA Replication, and RNA-Protein Interaction of Zika Virus. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 15 fev. 2020.

HUANG, K. et al. Cleavage by caspase 8 and mitochondrial membrane association activate the BH3-only protein bid during TRAIL-induced apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 22, p. 11843–11851, 2016.

KILBRIDE, S. M.; PREHN, J. H. M. Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function. **Oncogene**, v. 32, n. 22, p. 2703–2711, 2013.

KLASE, Z. A. et al. Zika Fetal Neuropathogenesis: Etiology of a Viral Syndrome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1–32, 2016.

KNOCHELMANN, H. M. et al. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 15, n. 5, p. 458–469, 1 maio 2018.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 485–517, 2009.

KUMAR, A. et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. **EMBO reports**, v. 17, n. 12, p. 1766–1775, 2016.

KYUNG, M. C. et al. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 50, p. 19111–19116, 2006.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LAUBER, K. et al. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 717–730, 2003.

LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis HHS Public Access. **Cell Host Microbe**, v. 19, n. 5, p. 720–730, 2016.

LEE, H. N. et al. Dendritic cells expressing immunoreceptor CD300f are critical for controlling chronic gut inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 5, p. 1905–1917, 2017.

LEE, J. K. et al. Zika Virus Induces Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL)-Mediated Apoptosis in Human Neural Progenitor Cells. **Cells**, v. 9, n. 11, 2020.

LEE, J. K.; SHIN, O. S. Advances in zika virus–host cell interaction: Current knowledge and future perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, 2019.

LEMKE, G. Biology of the TAM receptors. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 11, p. 1–17, 2013.

LI, S. et al. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are elevated in the guillain-barré syndrome and downregulated by IVIg treatments. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

LIMA, M. C. et al. The transcriptional and protein profile from human infected neuroprogenitor cells is strongly correlated to zika virus microcephaly cytokines phenotype evidencing a persistent inflammation in the CNS. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. AUG, 2019.

LIN;, S. et al. Zika virus NS5 protein antagonizes type I interferon production via blocking TBK1 activation. **Physiology*;* behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2019.

LIPIEC, E. et al. Molecular characterization of DNA double strand breaks with tip-enhanced Raman scattering. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 1, p. 169–172, 3 jan. 2014.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487–501, 2001.

MAGARIAN BLANDER, J.; MEDZHITOV, R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. **Nature**, v. 440, n. 7085, p. 808–812, 6 abr. 2006.

MANANGEESWARAN, M.; IRELAND, D. D. C.; VERTHELYI, D. Zika (PRVABC59) Infection Is Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 11, 1 nov. 2016.

MARTIN, C. J.; PETERS, K. N.; BEHAR, S. M. Macrophages Clean Up: Efferocytosis and Microbial Control The Many Jobs of the Macrophage. **Current Opinion in Microbiology**, v. 0, p. 17–23, 2014.

MARTINOT, A. J. et al. Fetal Neuropathology in Zika Virus Infected Pregnant Female Rhesus Monkeys. **Cell**, v. 173, n. 5, p. 1111–1122, 2019.

MAYER, C. T. et al. Selective and efficient generation of functional Batf3-dependent CD103 1 dendritic cells from mouse bone marrow. **Blood**, v. 124, n. 20, p. 3081–3091, 2014.

MCINTOSH, J. R. Assessing the contributions of motor enzymes and microtubule dynamics to mitotic chromosome motions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 33, p. 1–22, 2017.

MCKINSTRY, K. K. et al. IL-10 Deficiency Unleashes an Influenza-Specific Th17 Response and Enhances Survival against High-Dose Challenge. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 12, p. 7353–7363, 15 jun. 2009.

MCNAB, F. et al. Europe PMC Funders Group Type I interferons in infectious disease. v. 15, n. 2, p. 87–103, 2020.

MEDINA, C. B. et al. Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. **Nature**, v. 580, n. 7801, p. 130–135, 2 abr. 2020.

MEDINA, C. B.; RAVICHANDRAN, K. S. Do not let death do us part: “Find-me” signals in communication between dying cells and the phagocytes. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 6, p. 979–989, 1 jun. 2016.

MEERTENS, L. et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. **Cell Reports**, v. 18, n. 2, p. 324–333, 2017.

MERAD, M. et al. The dendritic cell lineage: Ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 563–604, mar. 2013.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, n. 7098, p. 39–44, 2006.

MILOUD; HÄMMERLING, G. J.; GARBI, N. Review of Murine Dendritic Cells: Types, Location,and Development. Em: NAIK, S. H. (Ed.). **Dendritic Cell Protocols, Methods in Molecular Biology**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. v. 595.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 2, p. 134–142, 2017.

MOK, M. Y. et al. The relation of interleukin 17 (IL-17) and IL-23 to Th1/Th2 cytokines and disease activity in systemic lupus erythematosus. **Journal of Rheumatology**, v. 37, n. 10, p. 2046–2052, out. 2010.

MORIOKA;, S.; MAUERÖDER, C.; RAVICHANDRAN, K. S. Living on the edge: Efferocytosis at the interface of homeostasis and pathology. **Physiology*;* behavior**, v. 176, n. 5, p. 139–148, 2019.

MUÑOZ;, L. S.; PARRA;, B.; PARDO;, C. A. Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 2, p. 257–262, 2017.

NAVECA, F. G. et al. Analysis of the immunological biomarker profile during acute zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 6, 1 jun. 2018.

NGONO, A.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Physiology*;* behavior**, v. 176, n. 5, p. 139–148, 2018.

NICOLE, L. G. B. et al. Topical Prostaglandin e analog restores defective dendritic cell-mediated Th17 host defense against methicillin-resistant staphylococcus aureus in the skin of diabetic mice. **Diabetes**, v. 65, n. 12, p. 3718–3729, 1 dez. 2016.

NIÑO-CASTAÑO, V. E. et al. RIP2 Contributes to Expanded CD4+ T Cell IFN-γ Production during Efferocytosis of Streptococcus pneumoniae –Infected Apoptotic Cells . **ImmunoHorizons**, v. 6, n. 7, p. 559–568, 1 jul. 2022a.

NIÑO-CASTAÑO, V. E. et al. RIP2 Contributes to Expanded CD4+ T Cell IFN-γ Production during Efferocytosis of Streptococcus pneumoniae –Infected Apoptotic Cells . **ImmunoHorizons**, v. 6, n. 7, p. 559–568, 1 jul. 2022b.

OH, Y. et al. Zika virus directly infects peripheral neurons and induces cell death. **Nat Neurosci**, v. 20, n. 9, p. 1209–1212, 2017.

OJHA, C. R. et al. Toll-like receptor 3 regulates Zika virus infection and associated host inflammatory response in primary human astrocytes. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1–26, 2019.

PAIVA, I. A. et al. Th17 cells in viral infections—friend or foe? **Cells**, v. 10, n. 5, 1 maio 2021.

PAN, Y. et al. The Dual Regulation of Apoptosis by Flavivirus. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. March, p. 1–17, 2021.

PAPRI, N. et al. Guillain–Barré syndrome in low-income and middle-income countries: challenges and prospects. **Nature Reviews Neurology**, v. 0123456789, 2021.

PARK, T. et al. Zika virus infection differentially affects genome-wide transcription in neuronal cells and myeloid dendritic cells. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, 1 abr. 2020.

PATEL, D. D.; KUCHROO, V. K. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. **Immunity**, v. 43, n. 6, p. 1040–1051, 2015.

PENTEADO, L. DE A. et al. Distinctive role of efferocytosis in dendritic cell maturation and migration in sterile or infectious conditions. **Immunology**, v. 151, n. 3, p. 304–313, 1 jul. 2017.

RALPH M. STEINMAN;; ZANVIL A. COHN. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 137, p. 1143–1162, 1973.

REINERT, L. S. et al. TLR3 deficiency renders astrocytes permissive to herpes simplex virus infection and facilitates establishment of CNS infection in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1368–1376, 2 abr. 2012.

RENAUDINEAU, Y. et al. Dysfunctional B cells in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, v. 3, n. 7- 8 SPEC.ISS., p. 516–523, nov. 2004.

RETALLACK, H. et al. Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 50, p. 14408–14413, 2016.

RIEDL, W. et al. Zika virus NS3 mimics a cellular 14-3-3-binding motif to antagonize RIG-I- and MDA5-mediated innate immunity William. **Physiology*;* behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2019.

SADLER, A. J.; WILLIAMS, B. R. G. Interferon-inducible antiviral effectors. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 7, p. 559–568, 2008.

SADRI NAHAND, J. et al. Cell death pathways and viruses: Role of microRNAs. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 24, n. June, p. 487–511, 2021.

SÁNCHEZ-SAN MARTÍN, C. et al. Differentiation enhances Zika virus infection of neuronal brain cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

SARKAR, S.; FOX, D. A. Targeting il-17 and th17 cells in rheumatoid arthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 345–366, maio 2010.

SCHOGGINS, J. W.; RICE, C. M. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 6, p. 519–525, 2011.

SEGAWA, K.; NAGATA, S. An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 11, p. 639–650, 1 nov. 2015.

SERMAN, T. M.; GACK, M. U. Evasion of innate and intrinsic antiviral pathways by the Zika Virus. **Viruses**, v. 11, n. 10, 2019.

SHAH, K. et al. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research and Therapy**, v. 12, n. 2, 24 mar. 2010.

SHANKAR, A.; PATIL, A. A.; SKARIYACHAN, S. Recent perspectives on genome, transmission, clinical manifestation, diagnosis, therapeutic strategies, vaccine developments, and challenges of zika virus research. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–14, 2017.

SHI, Y.; GAO, G. F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 443–456, 2017.

SLOMNICKI, L. P. et al. Ribosomal stress and Tp53-mediated neuronal apoptosis in response to capsid protein of the Zika virus. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2017.

SMITH, D. R. et al. Neuropathogenesis of Zika Virus in a Highly Susceptible Immunocompetent Mouse Model after Antibody Blockade of Type I Interferon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2017.

SOUZA, B. S. F. et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. December, p. 1–13, 2016.

SUBRAMANIAN, M. et al. An AXL/LRP-1/RANBP9 complex mediates DC efferocytosis and antigen cross-presentation in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 3, p. 1296–1308, 3 mar. 2014.

SULIMAN, A. et al. Intracellular mechanisms of TRAIL: Apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. **Oncogene**, v. 20, n. 17, p. 2122–2133, 2001.

SUZUKI, J. et al. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. **Science**, v. 341, n. 6144, p. 403–406, 2013.

SUZUKI, J.; IMANISHI, E.; NAGATA, S. Exposure of phosphatidylserine by Xkrelated protein family members during apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 44, p. 30257–30267, 31 out. 2014.

SUZUKI, T. et al. Infection with flaviviruses requires BCLXL for cell survival. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 9, 1 set. 2018.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Recognition of viruses by innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 220, n. 1, p. 214–224, 2007.

TAKEUCHI, S. et al. Mitotic genes are transcriptionally upregulated in the fibroblast irradiated with very low doses of UV-C. **Scientific Reports**, v. 6, 5 jul. 2016.

TANG, H. et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Precursors Attenuates Growth 2016 Tang. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 587–590, 2017.

TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to reconvalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 3, p. 269–273, 1 jun. 2016a.

TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to reconvalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 3, p. 269–273, 1 jun. 2016b.

TENG, Y. et al. An integrative analysis reveals a central role of P53 activation via MDM2 in Zika virus infection induced cell death. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1–12, 2017.

TORCHINSKY, M. B. et al. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T H17 cell differentiation. **Nature**, v. 458, n. 7234, p. 78–82, 5 mar. 2009a.

TORCHINSKY, M. B. et al. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T H17 cell differentiation. **Nature**, v. 458, n. 7234, p. 78–82, 5 mar. 2009b.

TRIPATHI, S. et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 3, p. 1–19, 2017.

TRUMAN, L. A. et al. CX3CL 1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 5026–5036, 2008.

TSAI, Y. T. et al. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 604–615, 2009.

TSOKOS, G. C. Mechanisms of Disease: Systemic Lupus Erythematosus. **N Engl J Med**, v. 22, n. 1, p. 2110–2131, 2011.

TUFAIL, Y. et al. Phosphatidylserine Exposure Controls Viral Innate Immune Responses by Microglia. **Physiology*;* behavior**, v. 66, n. 4, p. 693–698, 2017.

TURPIN, J. et al. The ZIKA virus delays cell death through the anti-apoptotic bcl-2 family proteins. **Cells**, v. 8, n. 11, 1 nov. 2019.

VALADÃO, A. L. C.; AGUIAR, R. S.; DE ARRUDA, L. B. Interplay between inflammation and cellular stress triggered by Flaviviridae viruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–19, 2016.

VANWALSCAPPEL, B.; TADA, T.; LANDAU, N. R. Toll-like receptor agonist R848 blocks Zika virus replication in human monocytes by inducing the antiviral protein viperin. **Virology**, v. 4, n. 11, p. 199–208, 2018.

VIELLE, N. J. et al. Silent infection of human dendritic cells by African and Asian strains of Zika virus. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

WANG, T. et al. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1366–1373, dez. 2004.

WANG, X. et al. A critical role of IL-17 in modulating the B-cell response during H5N1 influenza virus infection. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 8, n. 6, p. 462–468, nov. 2011.

WANG, Y. et al. Mer receptor tyrosine kinase promotes invasion and survival in glioblastoma multiforme. **Oncogene**, v. 32, n. 7, p. 872–882, 14 fev. 2013.

WILLISON, H. J.; JACOBS, B. C.; VAN DOORN, P. A. Guillain-Barré syndrome. **The Lancet**, v. 388, n. 10045, p. 717–727, 2016.

WONG, C. K. et al. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: Implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. **Clinical Immunology**, v. 127, n. 3, p. 385–393, jun. 2008.

WONG, W. W. L.; PUTHALAKATH, H. Bcl-2 family proteins: The sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. **IUBMB Life**, v. 60, n. 6, p. 390–397, 2008.

WU, B.; WAN, Y. Molecular control of pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases. **International Immunopharmacology**, v. 80, 1 mar. 2020.

WU, X. et al. Are Th17 cells and their cytokines a therapeutic target in Guillain-Barré syndrome? **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 20, n. 2, p. 209–222, 1 fev. 2016.

WU, Y. et al. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. **Cell Discovery**, v. 3, p. 1–14, 2017.

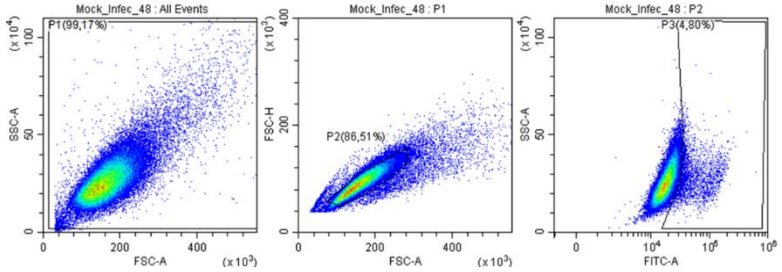
XU, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, p. 420–422, 1 abr. 2020.

YANG, J. et al. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 10, p. 493–500, 2014.

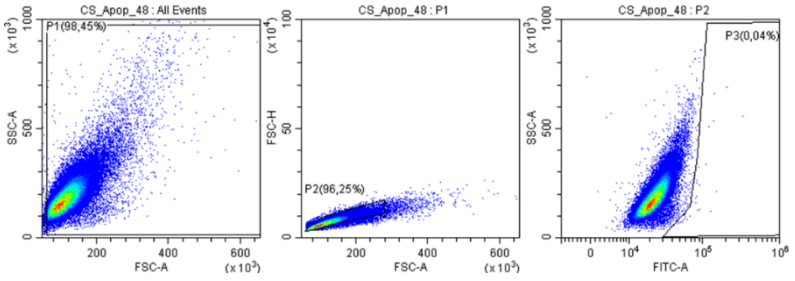
ZHENG, Y. et al. Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS 1-caspase-1 axis . **The EMBO Journal**, v. 37, n. 18, p. 1–18, 2018.

ANEXO A - ESTRATÉGIA DE "*GATING*"

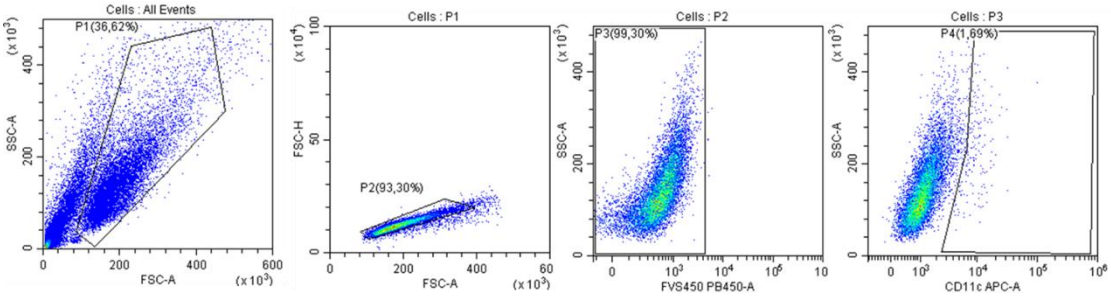
Para a aquisição de eventos na citometria de fluxo foram utilizadas estratégias de *gating* para cada experimento. Para avaliar a taxa de infecção foram feitas as exclusões de *debris* e *doublets* e definida a população positiva para FITC a partir da condição Mock



Para a avaliação da taxa de apoptose celular foram feitas as exclusões de *debris* e *doublets* e definida a população positiva para FITC a partir do controle secundário.



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.



Estratégia de seleção populacional de linfócitos para posterior caracterização de células CD4+IFN-g+, CD4+IL-17A+ e CD4+FoxP3+. A estratégia consistiu na eliminação de *doublets* e *debris*, eliminação de células positivas para *Fixable Viability Stain 780* e de células CD4 negativas, com o intuito de selecionar os linfócitos viáveis e CD4+.

