

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 29/07/2026.

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

R153i

Raimundo, Breno Vilas Boas.

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 (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

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

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

Profa. Dra. ALESSANDRA D'ALMEIDA FILARDY (Participação 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 Dejaní

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. Inicialmente 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 infecção 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 contendo 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 apoptóticas 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-Espinal

MFI – Intensidade da Mediana de Fluorescência

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

Mock - Controle Negativo

MOI - Multiplicidade de Infecção

NF- κ B - 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 <i>Guillain-Barré</i> 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 <i>Sorting</i>	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 ⁺ <i>naïve</i> 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 (<i>high rate</i> ZIKV-iAC)	57
6.8. Eferocitose de <i>high rate</i> 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+ <i>high rate</i> 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 Ngoni; 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 IKK ϵ , que fosforilam os fatores de transcrição IRF3/7, enquanto a proteína quinase IKK ϵ 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- κ B, 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

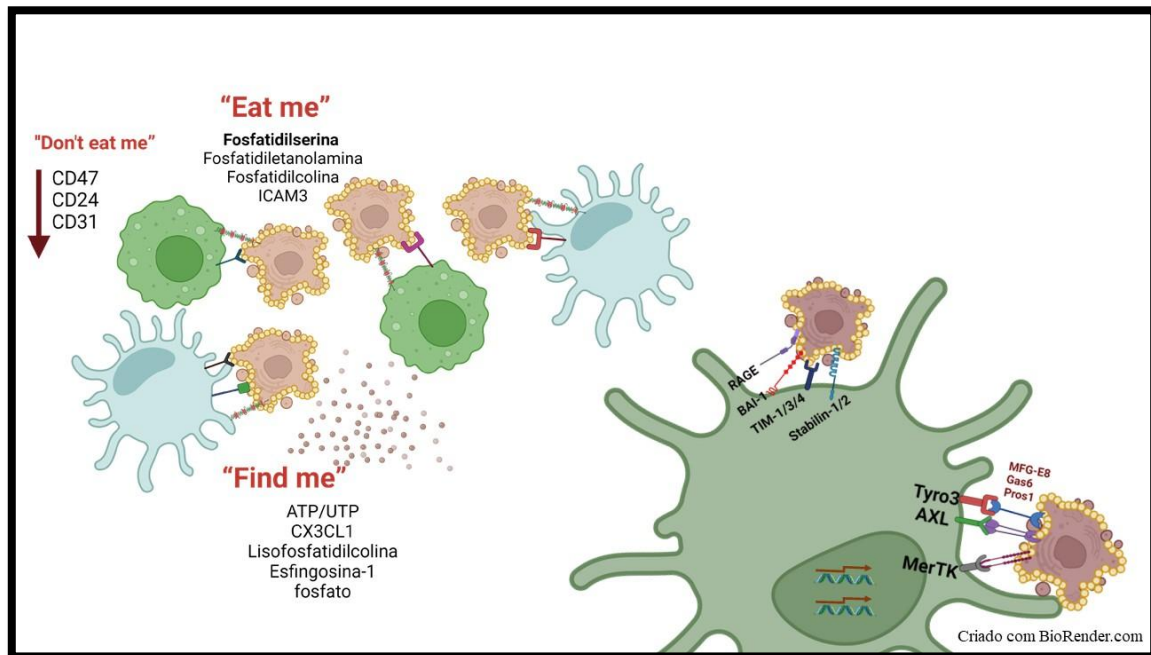
O corpo humano adulto é composto aproximadamente por 37,2 trilhões de células, e cerca de 0,4% dessas células entram em apoptose por dia (Bianconi *et al.*, 2013). A remoção eficiente dessas células apoptóticas (ACs) ocorre primordialmente por células fagocíticas profissionais, como macrófagos e células 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 CD8 α (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-Cabrero *et al.*,2021; Mayer *et al.*,2014). Por outro lado, as cDC2s apresentam baixa expressão de CD8 α 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-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e prostaglandina E₂ (PGE₂) 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). Niño-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-1 β , 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 (Anfesa *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 FcR γ , 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.

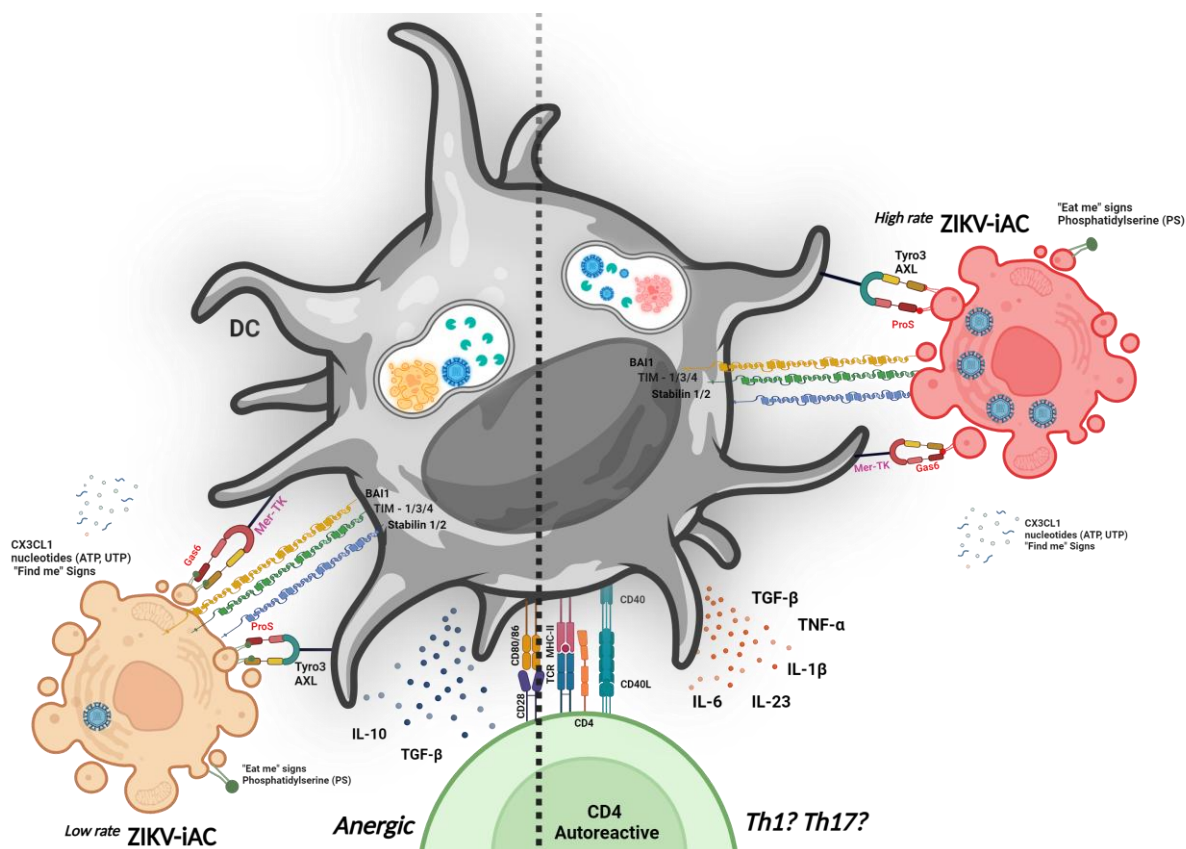
Subpopulações de linfócitos Th1 e Th17 têm sido descritas em várias doenças neuropáticas relacionadas a infecções virais anteriores. Em pacientes infectados pelo ZIKV durante a fase aguda, tem sido observado um aumento nos níveis de citocinas no soro, associado a diferentes subpopulações de linfócitos 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.*

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 infecção com altos títulos virais. Esses resultados sugerem que a eferocitose de uma baixa porcentagem de AC contendo 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.

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 acquire antigen from apoptotic cells and induce 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 phagocytic clearance. **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⁺ 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.

- TSAl, 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.
- TUFAl, 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 autoimmunity. **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.