

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 20/12/2020.

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

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

por

Matheus Rossi Avelar

Araraquara

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

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

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

Orientando: Matheus Rossi Avelar

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ivo de
Medeiros

Coorientadora: Dra. Pryscilla Fanini Wowk

Araraquara

2020

A948i

Avelar, Matheus Rossi.

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

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

Orientadora: Alexandra Ivo de Medeiros.

Coorientadora: Pryscilla Fanini Wowk.

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

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

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada



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



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

DISCENTE: MATHEUS ROSSI AVELAR

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

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

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

(X) APROVADO

() REPROVADO

PARECER CIRCUNSTANCIADO:

Araraquara, 20 de dezembro de 2019

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

Sumário

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

..... Erro! Indicador não definido.

5.5 Avaliação de fagocitose de células Huh7.5 infectadas com ZIKV por BMDCErro! Indicador não definido.

5.6 Avaliação da eferocitose de células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV por BMDC.Erro! Indicador não definido.

6. DISCUSSÃOERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

7. CONCLUSÕES**19**

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....**20**

ANEXOSERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

Anexo A. Estratégias de “gating”Erro! Indicador não definido.

Resumo

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

Palavras-chave: vírus Zika; eferocitose; ativação celular

Abstract

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

Keywords: Zika vírus; efferocytosis; cell activation

Lista de figuras

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

Lista de abreviaturas

AC – Células apoptóticas

ADP - Adenosina difosfato

AMP - Adenosina monofosfato

ATP - Adenosina trifosfato

BMDC – Células dendríticas derivadas de medula óssea

BOD - Incubadora refrigerada *Bio-Oxygen Demand*

DAMP – Padrões moleculares associados ao dano

CD - Células dendríticas

CFSE - Carboxifluoresceína succinimidil éster

DTg - animais duplo transgênicos

GBS - Síndrome de Guillain-Barré

GM-CSF - Granulocyte Macrophage colony stimulating factor

iACs – células apoptóticas infectadas

IL - Interleucina

LTC - Linfócitos T citotóxicos

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MOI - Multiplicidade de infecção

OVA - Ovoalbumina

PAMP – Padrões moleculares associados ao patógeno

PFA - paraformaldeído

PGE2 - prostaglandina E2

PRR- Pattern recognition receptors

PS – Fosfatidilserina

SFB - Soro fetal bovino

TGF- β - *Tumor growing factor beta*

TNF- α - *Tumor necrosis fator alpha*

UFF - Unidades formadoras de foco

ZIKV - Vírus Zika

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2. Vírus Zika e apoptose celular

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

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

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

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

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

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

7. Conclusões

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

8. Referências Bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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