

Nágela Ghabdan Zanluqui

**Papel dos neutrófilos e células T CD8 na infecção
por Zika vírus**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

São Paulo

2021

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP

Nágela Ghabdan Zanluqui

**Papel dos neutrófilos e células T CD8 na infecção
por Zika vírus**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

São Paulo

2021

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Zanluqui, Nagela Ghabdan
Papel dos neutrófilos e células T CD8 na infecção
por zika vírus / Nagela Ghabdan Zanluqui. -- São
Paulo, 2021.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientador: Jean Pierre Schatzmann Peron.

Descritores: 1.Zika vírus 2.Neutrófilos 3.Células
T CD8+ reguladoras 4.Flavivirus 5.Susceptibilidade
6.Placenta

USP/FM/DBD-340/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Ao meu porto seguro, minha querida
mãe, que sempre lutou por mim,
acreditou e me apoiou.

Ao meu pai, que lá do céu cuida de
mim. Saudades.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida. Por ter me dado paciência, perseverança e discernimento nos momentos que a vontade era de desistir. Por me mostrar que tudo tem o seu tempo e momento e que nada acontece por acaso.

À minha mãe Fátima, que sempre acreditou que seria possível, me apoio e motivou em todos os momentos. Sem você minhas conquistas não teriam o menor significado! Mamis, eu te amo!

Ao meu orientador e amigo, Jean Pierre, por toda confiança, paciência, orientação e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Sua paixão pela ciência me faz acreditar que vale a pena continuar. Obrigada por tornar o laboratório uma extensão de nossas casas. Obrigada por abrir as portas da sua casa e por todos os churrascos, festas e momentos de descontração, serei eternamente grata pela amizade!

Às amigas que o doutorado me deu: Carolina (Kero), Lilian (Lilis) e Marília (Má), pela amizade, apoio e toda ajuda. A alegria, companheirismo e ombro amigo foram fundamentais para que eu mantivesse o foco quando as coisas pareciam estar difíceis. Obrigada por todas as discussões científicas e àquelas que nem sei classificar. Obrigada por todas as risadas, viagens e todas as vezes que bebemos juntas. “Três contra um” não dever ser fácil, não!

Aos velhos e novos integrantes do Laboratório de Interações Neuroimunes, Cristiano, Carla, Wesley, Yan, Laura, Tiago, Pedro, Sandra e Patrick, obrigada por todas as risadas, todos os cafés e momentos de descontração.

Aos amigos que o ICB me deu: Rafael, João (Xu), Flávia e Igor (Amigor), muito obrigada pela amizade, incentivo, descontração e as festinhas juntos. Vocês são pessoas incríveis! Amo vocês.

À Cristiane e Tábata, pela amizade e discussões sobre os neutrófilos. Obrigada por me incentivarem.

À Claudia, pelo bom humor e disposição em nos ajudar diariamente, obrigada pela paciência e suporte no laboratório.

À Eleni, pela disponibilidade, atenção, paciência e bom humor com que me ajudou sempre que precisei. Muito obrigada.

À Professora Laura Mackay, por ter aberto as portas de seu laboratório durante meu BEPE. Por todos ensinamentos, e contribuição para a minha maturidade científica e pessoal. Muito obrigada.

Às amigas que o ICB me deu e a Austrália fortaleceu, Raissa e Maria, que juntamente com a Marcela, fizeram com que meus dias em Melbourne fossem mais leves e divertidos. Muito obrigada por terem me recebido de braços abertos. Obrigada pela amizade e ensinamentos. Sinto falta de vocês diariamente!

Aos amigos Andreas, Max e Susan, pelos ensinamentos e discussões. Vocês tornaram meus dias no laboratório na Austrália mais felizes.

À minha amiga Maria Isabel, que desde quando eu era sua IC me apoia e incentiva. Obrigada por estar sempre presente quando eu preciso. Obrigada pelo carinho e amizade.

Aos meus orientadores (e amigos) de mestrado, Phileno e Pryscilla, por todo aprendizado, apoio, incentivo e conselhos para que eu chegasse até aqui. Obrigada por tudo!

À minha tia Soraia, por ter aberto as portas da sua casa quando iniciei essa aventura chamada de doutorado. Seu apoio, parceria e amor, foram fundamentais nesta jornada. Serei eternamente grata. Amo você.

Aos meus tios Geraldo e Darci e prima Sonia, por todo apoio, incentivo e amor. Muito obrigada, amo vocês.

A todos os amigos e família que de certa forma me ajudaram a chegar até aqui. Muito obrigada!

APOIO FINANCEIRO

Meus agradecimentos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro. Processos: 2016/07371-2 e 2019/12431-2

“O acaso só favorece a mente preparada”

Louis Pasteur

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Flavivírus e Zika vírus.....	1
1.2. ZIKV e Resposta imune antiviral.....	4
1.3. Neutrófilos.....	9
1.4. Células T CD8.....	11
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivos específicos.....	17
2.1.1. Parte 1: Neutrófilos na infecção por ZIKV como cavalo Tróia para a disseminação viral.....	17
2.1.2. Parte 2: Células T CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ na infecção por ZIKV e seu papel na supressão da resposta imune.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Animais experimentais.....	19
3.2. Preparo do vírus e infecções.....	19
3.3. Unidade formadora de placa (UFP).....	19
3.4. Separação de neutrófilos murinos.....	20
3.4.1. Por gradiente de Percoll [®]	20
3.4.2. Por <i>Ficoll-Paque Plus</i> [®]	21
3.4.3. Por coluna magnética.....	21
3.5. Separação de neutrófilo humano de sangue periférico.....	22
3.6. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).....	22
3.6.1. Por DCFDA (<i>Cellular ROS Detection Assay</i> - Abcam [®]).....	22
3.6.2. Por quimiluminescência.....	22
3.7. Análise de morte celular.....	23
3.8. Ensaio de fagocitose.....	24
3.9. Imunofluorescência para detecção de NETs.....	24
3.10. Dissociação de placenta murina.....	24
3.11. <i>Cell sorting</i> de Neutrófilos de placenta murina.....	25
3.12. Transferência adotiva de neutrófilos.....	26
3.13. Tratamento com Filgrastim.....	26
3.14. Saliva de <i>Aedes aegypti</i>	26
3.15. <i>Primeflow</i> TM <i>RNA Assay</i> - para detecção de Zika vírus adaptado para imunofluorescência.....	27
3.16. Microscopia eletrônica.....	27
3.17. Citometria de fluxo para análise de marcadores celulares.....	28

3.17.1. Neutrófilos de medula óssea cultivados <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> de suspensão celular de placenta.....	28
3.17.2. Fenotipagem de células T CD8 reguladoras.....	29
3.18. Cinética de infecção.....	30
3.19. <i>Cell sorting</i> e transferência adotiva de células T CD8.....	30
3.20. BD Cytometry Beads Array – CBA.....	31
3.21. Extração de RNA.....	32
3.21.1. Amostras de cultura de neutrófilos.....	32
3.21.2. Amostras de tecido animal.....	32
3.21.3. Amostras de soro.....	32
3.21.4. Após separação celular por <i>Cell sorting</i>	33
3.22. Síntese de DNA complementar (cDNA).....	33
3.23. Quantificação por PCR em Tempo Real.....	33
3.24. RT ² Profiler PCR Array.....	34
3.25. Proteômica.....	35
3.25.1. Preparo e digestão das amostras.....	35
3.25.2. Análise LC-MS/MS em DIA.....	35
3.25.3. <i>Label-Free</i> Quantificação de Peptídeos e Taxas Proteicas.....	36
3.26. Mapeamento de RNA-seq e análise de expressão genica.....	36
3.27. Análise Estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Papel dos neutrófilos na infecção por Zika vírus.....	38
4.1.1. Zika vírus infecta e replica em neutrófilos de animais C57BL/6 e SJL.....	38
4.1.2. Zika vírus infecta e replica dentro em neutrófilos humanos sem induzir a liberação de NETs.....	42
4.1.3. Neutrófilos circulantes infectados por Zika vírus podem ser detectados na infecção experimental.....	48
4.1.4. Saliva de <i>Aedes aegypti</i> aumenta a infecção por ZIKV.....	50
4.1.5. Função dos neutrófilos na infecção por ZIKV.....	52
4.1.6. Neutrófilos auxiliam na disseminação de ZIKV para os fetos.....	54
4.1.7. Neutrófilos de placentas infectadas expressam marcadores de ativação celular e MHC-I.....	57
4.1.8. Indivíduos infectados com ZIKV produzem altos níveis de IL-8.....	63
4.1.9. Células T CD8 proliferam menos na presença de neutrófilos infectados por ZIKV.....	64
4.2. Papel dos linfócitos T CD8 reguladores na infecção por Zika vírus.....	66
4.2.1. Células T CD8 na infecção por ZIKV.....	66
4.2.2. A ausência de células T CD8 ⁺ altera o perfil de expressão gênica durante a infecção por ZIKV.....	67
4.2.3. Perfil de citocinas produzidas durante a infecção por ZIKV.....	69
4.2.4. Cinética de células T CD8 ⁺ na infecção por ZIKV.....	72
4.2.5. Células T CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ possuem funções ambíguas.....	84
5. DISCUSSÃO.....	86
CONCLUSÃO.....	103

REFÊRENCIAS	104
--------------------------	-----

ANEXOS

Anexo 1: Comitê de Ética CEUA ICB USP – Projeto células T CD8.....	122
Anexo 2: Comitê de Ética CEUA FMUSP – Projeto células T CD8.....	123
Anexo 3: Comitê de Ética CEUA ICB USP – Projeto neutrófilos.....	124
Anexo 4: Comitê de Ética ICB USP – Humanos.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<i>Abl1</i>	<i>Tyrosine-protein kinase Abl1 gene</i>
<i>Atg12</i>	<i>autophagy related 12 gene</i>
<i>Bcl2</i>	<i>Bcl2 apoptosis regulator gene</i>
<i>Bcl2l11</i>	<i>Bcl2 like 11 gene</i>
<i>Bmf</i>	<i>Bcl2 modifying factor gene</i>
C	proteína capsídeo
C5a	Componente do complemento 5 ^a
<i>Casp6</i>	<i>Caspase 6</i>
CCL	CC chemokine ligand
CD	Grupos de diferenciação
CD8 ⁺ reg	Células T CD8 ⁺ reguladoras
CEA	Ag carcinoembrionário
<i>Cox2</i>	<i>Ciclo-oxigenase-2 gene</i>
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CXCL	CX chemokine ligand
DENV	Vírus da dengue
<i>Dffa</i>	<i>DNA fragmentation fator subunit alpha gene</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	proteína envelope
EM	Elastase de neutrófilos
<i>Eomes</i>	<i>Eomesodermina</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
<i>Fasl</i>	<i>Ligante de Faz</i>
FcγII	Fc-gama receptor II
fMLP	N-formilmetionina
Foxp3	Forkhead box p3 gene
<i>Gadd45a</i>	<i>Growth arrest and DNA damage inducible alpha gene</i>
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-Related protein
<i>GzmB</i>	<i>granzima B gene</i>
HCV	Vírus da hepatite C
HHV-6	Herpes vírus humano 6
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
<i>Htt</i>	<i>Huntingtin gene</i>
IAV	Vírus da influenza A
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de Interferon
IL	Interleucina
ILT	Receptores inibitórios parecidos a imunoglobulinas
IRF	Interferon-regulatory factor
<i>Irgm1</i>	<i>Immunity related GTPase M gene</i>
ISG15	ISG15 ubiquitin like modifier
ISGs	Genes induzidos por interferon
IUGR	Restrição de crescimento intrauterino
JEV	Vírus da encefalite japonesa
KLRG1	Receptor G1 de lectina de células assassinas

LIF	Fator inibidor de leucemia
LTB4	Fator ativador de plaqueta e leucotrieno B4
MCP-1	Monocyte chemottractant protein-1
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5
MPO	Mieloperoxidase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MX1	MX dynamin like GTPase 1
NETs	Redes extracelulares de neutrófilos
NPC	Células precursoras neuronais
NS	proteínas não estruturais
OAS2	2'5'-oligoadenylate synthetase 2
PBMC	Células polimorfonucleares
<i>Prfl</i>	<i>Perforin 1 gene</i>
prM	precursor da membrana
RIG-I	Retinoic-acid-inducible gene 1
RNA	Ácido ribonucleico
RSV	Vírus sincicial respiratório
<i>Runx3</i>	<i>Runx Family transcription factor 3</i>
SCZ	Síndrome Congênita do ZIKV
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SNC	Sistema nervoso central
STAT	Signal transducer and activator of transcription
<i>Tbet</i>	<i>T-box genes encode transcription factor gene</i>
TBEV	Vírus da encefalite transmitida por carrapato
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Transforming growth factor beta
TNF	Tumor necrosis factor
<i>Tnfrsf11b</i>	<i>TNF receptor superfamily member 11b gene</i>
TORCH	Conjunto de infecções transplacentária
Treg	Células T CD4 ⁺ reguladoras
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WNV	Vírus do oeste do Nilo
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Vírus da Zika

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação rendimento de neutrófilos após gradiente de Percoll.....	21
Figura 2: Estratégia de gate da produção de ERO quantificada por DCFDA®.....	23
Figura 3: Estratégia de gate dos ensaios de morte celular por anexina-V e 7AAD.....	23
Figura 4: Estratégia de gate para o isolamento de Neutrófilos da placenta por <i>cell-sorting</i>	25
Figura 5: Estratégia de gate para a análise de fenotipagem de neutrófilos.....	28
Figura 6: Estratégia de gate realizada para a análise das células T CD8 reguladoras.....	30
Figura 7: Zika vírus infecta neutrófilos de animais C57BL/6.....	39
Figura 8: Expressão gênica de neutrófilos infectados com ZIKV.....	41
Figura 9: Expressão de marcadores de ativação em neutrófilos infectados com ZIKV <i>in vitro</i>	43
Figura 10: Zika vírus infecta neutrófilos de animais SJL.....	44
Figura 11: Zika vírus infecta neutrófilos humanos.....	45
Figura 12: Zika vírus infecta neutrófilo humano sem induzir NETs.....	47
Figura 13: Infecção <i>in vivo</i> de neutrófilos em modelo experimental de Zika vírus.....	49
Figura 14: Expressão de marcadores de ativação em neutrófilos peritoneais de animais infectados com ZIKV <i>in vivo</i>	50
Figura 15: Saliva de <i>Aedes aegypti</i> induz o aumento da viremia.....	51
Figura 16: Menor número de neutrófilos nas primeiras horas de infecção resulta em menor viremia.....	53
Figura 17: Aumento do número de neutrófilos nas primeiras horas de infecção resulta em maior viremia.....	54
Figura 18: Transferência de neutrófilos infectados é capaz de causar infecção sistêmica.....	55
Figura 19: Aumento do número de neutrófilos nas primeiras horas de infecção resulta em maior carga viral na prole.....	56
Figura 20: Análise de RNAseq de células CD45 ⁺ de placenta de indivíduos infectados com ZIKV no primeiro trimestre de gestação.....	58
Figura 21: Quantidade de neutrófilos e células CD11b ⁺ Ly6G ⁻ na placenta.....	59
Figura 22: Neutrófilos de placenta de animais infectados por ZIKV expressão marcadores de ativação celular.....	60
Figura 23: Perfil de proteínas dos neutrófilos de placenta infectados com ZIKV.....	61
Figura 24: Perfil de citocinas produzidas durante infecção por arboviroses.....	63
Figura 25: Proliferação de células T CD8 ⁺ na presença de neutrófilos infectados com ZIKV.....	64
Figura 26: Perfil da carga viral de animais C57BL/6 e animais deficientes de células T CD8 ⁺ infectados com ZIKV.....	67
Figura 27: Perfil transcricional do baço de animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8 ^{-/-} infectados com ZIKV.....	70
Figura 28: Perfil de citocinas no baço de animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8 ^{-/-} infectados com ZIKV.....	71
Figura 29: Citocinas no soro de animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8 ^{-/-} após a infectados com ZIKV.....	72
Figura 30: Cinética das populações de T CD8 ⁺ e T CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ no baço de animais C57BL/6 infectados com ZIKV.....	73
Figura 31: Expressão de IL-33 no baço de animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8 ^{-/-} na infecção por ZIKV.....	74

Figura 32: Perfil diferencial de células T CD8 ⁺	76
Figura 33: Perfil das células T CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ naïve e pós infecção por ZIKV.....	77
Figura 34: Diferentes populações de células T CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ entre animais naïve e pós infecção por ZIKV.....	78
Figura 35: Populações de células T CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ presentes apenas em animais naïves....	79
Figura 36: Populações de células T CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ presentes apenas em animais infectados com ZIKV.....	81
Figura 37: Expressão diferencial entre células T CD8 ⁺ Foxp3 ⁺ e T CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	82
Figura 38: Expressão diferencial entre células T Foxp3 ⁺	83
Figura 39: Função das células T CD8 ⁺ Foxp3 ⁺	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados para a avaliação de expressão gênica por RT-qPCR Sybr.....	34
Tabela 2: Genes positivamente e negativamente regulados durante a infecção por ZIKV em animais CD8 ^{-/-}	68

RESUMO

Zanluqui NG. *Papel dos neutrófilos e células T CD8 na infecção por Zika vírus* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Infecções por flavivírus são causa de grande preocupação em todo o mundo devido às recorrentes epidemias e altos índices de mortalidade, sendo um grande problema de saúde pública. A relevância do estudo da infecção por ZIKV ganhou destaque devido ao enorme número de bebês nascidos com microcefalia, especialmente no Nordeste Brasileiro, tendo em maio de 2016 sido comprovada a relação causal entre a infecção por ZIKV durante a gestação e os casos de microcefalia. Sabendo-se que o ZIKV, assim como outros flavivírus, tem a capacidade de modular a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro, este projeto visou compreender o papel dos neutrófilos e de células T CD8⁺Foxp3⁺ no controle da replicação viral e na progressão da doença em modelo de infecção murina por ZIKV. Para isso, neutrófilos de sangue periférico de indivíduos saudáveis e neutrófilos de medula óssea de animais C57BL/6 e SJL foram utilizados para os experimentos *in vitro* e, para os experimentos *in vivo*, animais C57BL/6 IFNAR^{-/-}, C57BL/6 WT, C57BL/6 Foxp3GFP e C57BL/6 CD8^{-/-} foram infectados ou não com ZIKV. Foram realizadas análises para quantificação viral, expressão gênica e citometria de fluxo. Nossos resultados mostraram que ZIKV é capaz de infectar neutrófilos murinos e humanos *in vitro* sem interferir na meia-vida, produção de ROS e liberação de NETs destas células, além de não induzir expressão de marcadores de ativação celular como MHC-I, MHC-II, CD80, CD86 e IFNAR. Em consideração à expressão gênica, apenas *Ifn-b*, *Axl*, *Nos2* e *Tnf* foram alterados. Adicionalmente, neutrófilos infectados com ZIKV foram detectados em sangue e placenta de animais infectados. A transferência de neutrófilos infectados com ZIKV *in vitro* para animais prenhes foi capaz de causar infecção sistêmica, além da transferência de partículas virais para os fetos, provando que os neutrófilos podem agir como cavalo de Tróia para replicação e disseminação viral na infecção por ZIKV. Por outro lado, a infecção de animais deficientes de células CD8⁺ apresentou um perfil oscilatório, tendo maior cópias virais no soro, enquanto que menor número de partículas virais no baço em comparação ao grupo controle. Além disso, a análise por PCR Array evidenciou alterações na expressão de genes relacionados ao reconhecimento viral, como o *Tlr3* e *Nod2* e resposta imune do hospedeiro, como *Nfkb1*, *FasL* e *Ifn-a*. A análise das populações de células do baço mostrou que a infecção por ZIKV induz o aumento da população de células T CD8⁺Foxp3⁺. Estas células induzidas durante a infecção por ZIKV expressam altos níveis de FasL e Ly6C e parecem não responder à infecção por ZIKV, enquanto que células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais naïve induzem maior replicação viral em experimento de transferência adotiva. Tais achados nos levam a crer que existe uma tentativa do patógeno em modular a resposta imune inata e adaptativa no intuito de facilitar sua replicação e permanência no hospedeiro. Em suma, este trabalho buscou elucidar a imunobiologia da infecção pelo ZIKV na gestação, correlacionando com a susceptibilidade à Síndrome Congênita Causada pelo vírus.

Descritores: Zika vírus; Neutrófilos; Células T CD8⁺ reguladoras; Flavivírus; Susceptibilidade; Placenta.

ABSTRACT

Zanluqui NG. *The role of neutrophils and CD8 T cells in Zika virus infection* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Flavivirus infections are a cause of great concern around the world due to recurrent epidemics and high mortality rates, being a major public health problem. The relevance of the study of ZIKV infection was highlighted due to the huge number of babies born with microcephaly, especially in Northeast Brazil, and in May 2016 our group proved the causal relationship between ZIKV infection during pregnancy and cases of microcephaly. Knowing that ZIKV, as other flaviviruses, has the ability to modulate the host's innate and adaptive immune response, this project aimed to understand the role of neutrophils, and CD8⁺Foxp3⁺ T cells, in the control of viral replication and in disease progression in a murine ZIKV infection model. For this, peripheral blood neutrophils from healthy individuals and bone marrow neutrophils from C57BL/6 and SJL animals were used for *in vitro* experiments, and for *in vivo* experiments, C57BL/6 IFNAR^{-/-}, C57BL/6 WT, C57BL/6 Foxp3GFP and C57BL/6 CD8^{-/-} mice were infected with ZIKV, followed by the most varied analyzes for viral quantification, gene expression and cell populations of interest. Our results showed that ZIKV was able to infect murine and human neutrophils *in vitro* without interfering with the half-life, ROS production and NET release of these cells, in addition to not inducing expression of cell activation markers such as MHC-I, MHC-II, CD80, CD86 and IFNAR. Regarding gene expression, only *Ifn-b*, *Axl*, *Nos2* and *Tnf* were altered. Additionally, ZIKV-infected neutrophils were detected in blood and placenta from infected mice, and the transfer of *in vitro* ZIKV-infected neutrophils to pregnant mice was capable to cause systemic infection, in addition to the transfer of viral particles to fetuses, proving that neutrophils can act as a Trojan horse for viral replication and dissemination in ZIKV infection. On the other hand, the infection of mice deficient in CD8⁺ cells presented an oscillatory profile, with higher viral copies in the serum, while a lower number of viral particles in the spleen compared to the control group. Furthermore, PCRArray analysis showed alterations in the expression of genes related to viral recognition, such as *Tlr3* and *Nod2* and host immune response *Nfkb1*, *FasL* and *Ifn-a*. The analysis of spleen cell populations showed that ZIKV infection induces an increase in the population of CD8⁺Foxp3⁺ T cells, the CD8⁺regulators. However, these cells induced during ZIKV infection express high levels of FasL and Ly6C and seems to be not responder to ZIKV infection, whereas CD8⁺Foxp3⁺ T cells from naïve mice induce greater viral replication in adoptive transfer experiment. Such findings lead us to believe that there is an attempt by the pathogen to modulate the innate and adaptive immune response, in order to facilitate its replication and permanence in the host. In summary, this work sought to elucidate the immunobiology of ZIKV infection during pregnancy, and to correlate it with the susceptibility to Congenital Syndrome Caused by the virus.

Descriptors: Zika virus; Neutrophils; CD8⁺ regulatory T cells; Flavivirus; Susceptibility; Placenta.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Flavivírus e Zika vírus

Infecções por flavivírus são causa de grande preocupação devido às recorrentes epidemias e altos índices de mortalidade, sendo um problema de saúde pública mundial. O gênero Flavivírus compreende mais de 70 vírus, como o vírus da dengue (DENV), vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV), vírus do oeste do Nilo (WNV), vírus da hepatite C (HCV) e vírus da febre amarela (YFV)¹, sendo o Zika vírus (ZIKV) um dos integrantes deste grupo². As doenças relacionadas às infecções por flavivírus apresentam sintomas variados, desde dores de cabeça, febre e náuseas, como uma pseudo-gripe, à encefalite grave e doença hemorrágica^{1,3,4}.

Os vírus pertencentes ao gênero Flavivírus partilham estruturas simétricas, nucleocapsídeo icosaédrico e são envelopados, sendo constituídos de RNA de fita simples e de polaridade positiva. Cada partícula viral tem aproximadamente 50µm de diâmetro. O RNA genômico contém a cauda 5' cap e 3' CU-OH conservados que, uma vez no citoplasma da célula hospedeira, traduzem diretamente uma cadeia longa de peptídeos. Esta cadeia polipeptídica é clivada e processada por proteases, virais e do hospedeiro, em três proteínas estruturais: capsídeo (C), precursor da membrana (prM) e envelope (E), além de sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5)². Enquanto as proteínas estruturais são importantes para a invasão celular⁵⁻⁷, as proteínas NS participam de várias etapas necessárias para a replicação do RNA, montagem dos vírions e evasão do sistema imune⁸.

NS1 é uma glicoproteína necessária para a síntese da fita negativa de RNA^{9,10} enquanto NS2 está relacionada à geração de membrana durante a montagem e liberação de partículas infecciosas^{11,12}. NS2B é necessário como cofator para a atividade de NS3¹³⁻¹⁵, sendo NS3 uma proteína multifuncional com atividade de serina protease, nucleotídeo trifosfatase (NTPase), 5'-RNA trifosfatase (RTPase) e helicase¹⁶⁻¹⁸. NS4A faz parte do complexo de replicação viral^{19,20}, enquanto que NS4B tem sido reportado como inibidor de interferon do tipo I e modulador da síntese de RNA viral²¹⁻²³. NS5 é uma proteína com múltiplas funções, conhecida como RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp)^{24,25}. NS2A, NS4A, NS4B e NS5A interferem diretamente na resposta imune do hospedeiro^{22,26-30}. Apesar de muito ter sido descrito, ainda há muitas lacunas a serem elucidadas acerca da função biológica dessas proteínas.

Identificado pela primeira vez em 1947 em macaco *Rhesus sp.* sentinelas na floresta de Ziika em Uganda, na África³¹, o ZIKV espalhou-se recentemente pelo mundo. Após o primeiro surto documentado na Micronésia em 2007, e antes de se espalhar pelo Pacífico, causou grande epidemia na Polinésia Francesa entre 2013 e 2014³², e em maio de 2015 o primeiro caso confirmado no Brasil^{33,34}. Duas hipóteses foram levantadas para tentar explicar a entrada do vírus no país. A primeira, de que o vírus teria sido introduzido durante a Copa do Mundo em 2014³³ e, a segunda, sugere que tenha sido durante o Campeonato Mundial de “Sprint” no Rio de Janeiro, também em 2014, em que participaram atletas de quatro países do Pacífico (Polinésia Francesa, Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Pascoa) os quais documentaram casos de ZIKV em 2014³⁵.

Independente do ponto de entrada, o ZIKV alcançou todo o país e, até o final de 2015, os casos autóctones confirmados foram identificados em todas as cinco regiões do Brasil. Acredita-se que a disseminação nas Américas tenha sido em parte, devido à abundância do mosquito vetor *Aedes aegypti* em regiões tropicais do globo³⁶⁻³⁸.

A transmissão sexual foi comprovada, uma vez que se pode detectar genoma viral no sêmen de indivíduos residentes ou turistas das áreas de risco³⁹⁻⁴¹. Além disso, pesquisas mostraram que células de Sertoli podem ser infectadas por ZIKV e suportam os altos níveis de replicação viral⁴²⁻⁴⁴, servindo como reservatórios e garantindo que a transmissão sexual ocorra^{41,45,46}. Experimentalmente, mostrou-se que animais submetidos à infecção transgenital apresentam alto *score* clínico e conseqüentemente sucumbem à infecção⁴⁷. Contudo, a forma vertical da infecção⁴⁸ se apresentou como a mais preocupante, por ser a causa de neurocomprometimento e neurodegeneração, causando sérios problemas cognitivos^{49,50}. E, por último, vale mencionar um único caso de transmissão por secreção lacrimal⁵¹.

ZIKV pode ser dividido em duas grandes linhagens: Asiática e Africana^{37,52}. Na África, o vírus é mantido num ciclo que envolve a transmissão entre primatas não humanos (macacos) e mosquitos, sendo humanos hospedeiros ocasionais^{53,54}. Entretanto, em outras áreas, seres humanos podem ter se tornado o principal hospedeiro³⁸. A análise filogenética do vírus Zika presente no surto em Suriname e na Polinésia Francesa indica ser pertencente ao genótipo asiático⁵⁵, o mesmo que pode ser observado em amostra de pacientes brasileiros^{56,57}.

Durante os surtos de infecções em 2007 na Micronésia³⁸, e em 2014, na Polinésia Francesa⁵⁸, um grande número de pessoas apresentaram sintomas como, febre moderada (37,8 - 39,5 °C), dores de cabeça, artralgia, conjuntivite e erupções cutâneas maculopapular (*rash* cutâneo). Inicialmente, acreditava-se se tratar de infecções por DENV, porém, posteriormente, descobriu-se que se tratava do surto de infecções por ZIKV³⁸. Além disso, notou-se o aumento significativo no número de casos com complicações neurológicas periféricas graves, como Síndrome de Guillain-Barré (GBS). A relevância do estudo da infecção por ZIKV só ganhou destaque após o enorme número de bebês nascidos com microcefalia.

Em 2016, 216.207 casos foram registrados durante a grande epidemia de ZIKV. No ano seguinte, 17.594 foram os casos prováveis de infecção. Em maio de 2018, o Brasil apresentava 2.234 casos prováveis de infecção por vírus Zika, com taxa de incidência de 1,1 casos/100 mil habitantes. Sendo as regiões Centro-Oeste e Norte as que apresentam as maiores taxas de incidência: 4,5 e 1,9 casos/100 mil habitantes, respectivamente⁵⁹. Atualmente, de acordo com o Ministério da Saúde, 327 casos de ZIKV foram notificados, isso corresponde a taxa de incidência de 0,15 casos/100mil habitantes no país, os estados do Acre e Tocantins apresentaram as maiores taxas de incidência, sendo 3,47 e 1,15 casos/100mil habitantes⁶⁰.

Sabe-se que a microcefalia é apenas um dos sinais que caracterizam a Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ). Embora seja inquestionavelmente o sinal mais dramático, bebês nascidos de mães infectadas na gestação podem apresentar, além da microcefalia, outros sinais, como artrogripose, restrição de crescimento intrauterino (IUGR), uveíte, degeneração de retina e artrogripose^{49,50}, como revisado por Polonio e colaboradores em 2017⁶¹.

A relação entre o ZIKV e a microcefalia foi comprovada em três trabalhos publicados em modelos experimentais utilizando camundongos susceptíveis à infecção⁶²⁻⁶⁴. Dois dos trabalhos utilizaram animais deficientes do receptor de Interferon do tipo I (IFNAR1^{-/-}) ou anticorpos bloqueadores de IFNAR⁶² para reduzir a resposta imune de IFNs tipo I, tão importantes no controle do ZIKV. Além disso, realizaram injeção transuterina e intra-cerebroventricular nos filhotes durante a gestação⁶³. Apesar de serem estas metodologias um tanto questionáveis, uma vez que fogem ao que ocorre naturalmente, estes trabalhos muito contribuíram para uma melhor compreensão dos

mecanismos utilizados pelo ZIKV no desenvolvimento de lesões no sistema nervoso central.

Por outro lado, o trabalho publicado por nosso grupo demonstrou que os filhotes de fêmeas de camundongos SJL infectadas com ZIKV durante a gestação apresentavam: IUGR, caracterizada pela diminuição do peso e tamanho dos neonatos e, microcefalia, caracterizada por menor comprimento, altura e distância biparietal, além da presença de lesão tecidual característica, com diminuição do córtex cerebral, vacuolização nuclear, marginalização da cromatina em neurônios no córtex, tálamo e hipotálamo⁶⁴, muito semelhante àquelas demonstrada por Bell e colaboradores em 1971⁶⁵. Além disso, a infecção por ZIKV influencia na regulação de genes intimamente ligados a autofagia e apoptose, como *Bmf*, *Irgm1*, *Bcl2*, *Htt*, *Casp6* e *Abl1* que são positivamente regulados, e *Gadd45a*, *Tnfrsf11b*, *Fasl*, *Atg12*, *Bcl2l11* e *Dffa* negativamente regulados no cérebro de neonatos de animais SJL infectados por ZIKV⁶⁴.

Entretanto, quando o mesmo experimento foi realizado em animais C57BL/6 WT, observamos que estes animais são resistentes à infecção⁶⁴. Isso mostra que as diferenças genéticas influenciam na susceptibilidade ao ZIKV e, principalmente, no desenvolvimento da microcefalia. Estas alterações podem estar relacionadas à múltiplos fatores, dentre eles, à resposta imune antiviral de IFN tipo I da mãe, ou aos receptores de invasão viral^{5,66}, o que pode ser o motivo de apenas 6 a 12% do aparecimento de SCZ em crianças nascidas de gestantes infectadas por ZIKV⁶⁷⁻⁶⁹. O que pode ser demonstrado no trabalho de McGrath e colaboradores (2017), em que NPCs de diferentes indivíduos pode responder diferentemente após infecção por ZIKV, modulando as vias de sinalização intracelular, especialmente as relacionadas à imunidade inata, ciclo celular, e mTOR⁷⁰. Em estudo com gêmeos expostos a infecção por ZIKV durante a gestação, em que apenas um apresentou SCZ, mostrou-se que a taxa de replicação do ZIKV em NPCs derivadas de iPS do bebê afetado pelo ZIKV é maior em comparação ao bebê não afetado. Além disso, o transcriptoma destas células revelaram um diferente perfil de expressão gênica, evidenciado nas vias de sinalização de Wnt e mTOR⁷¹.

1.2. ZIKV e Resposta imune antiviral

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Componentes importantes deste sistema incluem macrófagos, células dendríticas, células

natural killers (NK), mastócitos, neutrófilos e o sistema complemento, com funções de limitar infecções virais principalmente pela liberação de IFN, além de outros mediadores inflamatórios^{72,73}.

A resposta inflamatória é orquestrada pelas citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL) -1 e IL-6. Estas citocinas são proteínas pleiotrópicas que regulam a morte celular dos tecidos inflamados, modificam a permeabilidade endotelial vascular, e induzem o recrutamento de células do sangue para os tecidos, além da produção de proteínas de fase aguda⁷⁴.

Embora muitas citocinas e quimiocinas sejam produzidas por células infectadas, os IFNs tipo I são as principais envolvidas em respostas antivirais. Enquanto os IFNs do tipo I podem ser produzidos por todas as células nucleadas, o IFN do tipo II, IFN- γ , é produzido apenas por células T e células NK⁷⁵. O grupo classificado como do tipo I incluem múltiplas isoformas, como IFN- α e IFN- β , que induzem morte celular por apoptose de células infectadas, ou tornam estas células mais resistentes à infecção. Não menos importante, estes induzem a ativação da resposta imune adaptativa⁷⁶.

A resposta antiviral dos IFNs tipo I é regida pela expressão de genes provenientes da atividade de IRF-3 e IRF-7 que inclui os genes induzidos por interferon (ISGs), como: OAS2, OSA, ISG15 e MX1, e quimiocinas inflamatórias, como CXCL10, CCL5 e CXCL11^{5,77}. O sistema induzido por IFN é conhecido por desempenhar um papel fundamental contra infecções por DENV e WNV⁷⁸⁻⁸¹. Além disso, o pré-tratamento de fibroblastos de pele com IFN recombinante humano do tipo I e II, IFN- α/β e IFN- γ , respectivamente, restringem significativamente as infecções por ZIKV de maneira dose dependente, o que apoia a importância do IFN no controle da infecção e patogênese por ZIKV^{5,82}.

Como citado acima, ZIKV, como outros flavivírus, dependem do bloqueio da sinalização de IFN do tipo I para se multiplicar e estabelecer infecção. Ativação da sinalização de IFN via receptores de IFN (IFNAR1 e IFNAR2) e subsequente ativação da via Jak/Stat (Jak1, TYK2 e STAT1 / STAT2), leva à produção dos ISGs⁸³ o que restringe a infecção e modula a imunidade inata e adaptativa.

Flavivírus possuem mecanismos que, eficientemente, antagonizam a sinalização de IFN em seres humanos, como NS3 e NS5, que induz a degradação de proteínas do hospedeiro, como STAT2, via proteassoma⁸⁴. Em contraste, foi demonstrado que, em

modelo murino, a proteína NS5 do ZIKV não possui tal capacidade e, portanto, sinalização de IFN tipo I é funcional, o ZIKV é incapaz de estabelecer infecção em camundongos respondedores para esta citocina^{85,86}. No entanto, foi demonstrado que a NS5 pode estar relacionada com a indução da sinalização de IFN do tipo II, uma vez que a NS5 não possui nenhuma influência sob a estabilidade ou translocação nuclear de STAT1. Portanto, a formação de homodímeros de STAT1, recrutamento de ISGs e genes que codificam citocinas pro-inflamatórias estão aumentadas durante a infecção⁸⁷.

Resposta imune adaptativa também possui funções importantes no controle de infecções por flavivírus. Células T CD4⁺ contribuem para a eliminação de infecções virais por meio de vários mecanismos, incluindo a ativação e estimulação de linfócitos B e T CD8⁺ e produção de citocinas inflamatórias e antivirais. Linfócitos B e T CD8⁺ requerem sinais co-estimulatórios de linfócitos T CD4⁺⁸⁸, seja diretamente, como pela via CD40 – CD40L⁸⁹, ou pela produção de citocinas como o IFN- γ , por exemplo. Além da produção de quimiocinas que atraem os linfócitos T CD8⁺ para o local da infecção⁹⁰.

No contexto de infecção por flavivírus, já se demonstrou que a interação entre CD40-CD40L de CD4⁺ e T CD8⁺ auxilia no desenvolvimento de células T CD8⁺ de memória⁹¹. T CD4⁺ são necessárias para manter respostas de células T CD8⁺ contra WNV⁹², além disso, estas interações são necessárias para eficiente produção de anticorpos e tráfego de células T CD8⁺ efectoras para o SNC em infecção por WNV⁹³.

Infecções por DENV induz produção de citocinas inflamatórias que atraem as células do sistema imune adaptativo. Células T naïve específicas sofrem expansão clonal, produzem mediadores inflamatórios e auxiliam na produção de imunoglobulinas, o que leva a resolução da infecção. Entretanto, este cenário muda de forma significativa em infecções secundárias por outro sorotipo de DENV⁹⁴, e as células T possuem importante papel no desenvolvimento do perfil hemorrágico da infecção por DENV.

Em reinfecções, tanto as células T CD8⁺ de memória quanto as naïve para o sorotipo atual são ativadas^{95,96} e produzem altos níveis de IFN- γ e TNF- α precocemente^{3,97-100}. Entretanto, neste cenário, as células T do sorotipo de reação cruzada são preferencialmente ativadas durante uma infecção secundária⁹⁷ e apresentam altos índices de degranulação³, produção de citocinas e, ainda, atividade citolítica alterada^{98,101}. A produção descontrolada de citocinas por estas células contribui para o agravamento da infecção, como disfunção ou danos das células endoteliais, levando ao extravasamento de

plasma, uma das características da febre hemorrágica ou choque durante a reinfecção pelo vírus da dengue^{95,101}.

Outra estratégia de infecção utilizada pelo DENV é a utilização de anticorpos produzidos pelo hospedeiro a fim de aumentar a absorção de vírions em células portadoras de receptores FcγII, processo conhecido como enriquecimento dependente de anticorpo¹⁰². O aumento da gravidade da doença durante infecções primárias por DENV em crianças nascidas de mães imunes a algum sorotipo do vírus pode ser devido à transferência transplacentária de anticorpos específicos contra DENV, e desta forma, reforçando a infecção primária e a carga viral^{103,104}. Primatas não humanos que receberam imunização passiva com anticorpos anti-DENV prévia à infecção, apresentaram aumento da viremia, o que reforça a ideia de enriquecimento dependente de anticorpo^{105,106}.

Resposta de células T CD8 citolíticas em modelo murino contra ZIKV mostrou ter papel crucial para proteção contra a infecção. Camundongos deficientes de CD8 sucumbem à infecção, atingindo 100% de mortalidade em até 18 dias pós infecção¹⁰⁷. A resposta das células T CD8⁺ foi caracterizada como citotóxica e direcionada a vários epítomos, principalmente da proteína de envelope do ZIKV, restritos ao H-2^b em camundongos C57BL/6^{107,108}. Epítomos estes que são compartilhados entre as linhagens de ZIKV Africana e Asiática¹⁰⁷.

ZIKV e DENV são flavivírus antigenicamente relacionados, células T CD8⁺ de animais previamente expostos a ZIKV reagem cruzadamente contra DENV¹⁰⁹, e o oposto também é observado¹¹⁰. Entretanto, se imunidade pré-existente contra DENV ou ZIKV possa promover proteção cruzada ou aumento da infecção, ainda está sob debate. Parece que, a transferência adotiva de células T CD8⁺ anti-DENV pode promover proteção cruzada contra ZIKV, enquanto que, o soro anti-DENV não¹¹⁰.

No entanto, nem sempre a presença de células T CD8 antígeno-específicas resulta em benefício ao hospedeiro. Em ambos modelos de infecção experimental, de susceptibilidade (IFNAR^{-/-}) ou resistência (C57BL/6 WT), ZIKV atinge o sistema nervoso central (SNC) causando graves problemas neurológicos como, paralisia, tremores, ataxia e convulsões¹¹¹. Entretanto, o espalhamento viral no SNC é dependente da deficiência de sinalização de IFN tipo I e a infecção de astrócitos resulta em quebra da barreira hematoencefálica o que causa grande influxo de células CD8 efetoras para dentro do SNC. A entrada de células CD8 anti-ZIKV no SNC é de grande importância no

controle da infecção de neurônios, embora, como consequência, fomenta o dano neuronal e paralisia associada à infecção por ZIKV¹¹².

Manangeeswaran e colaboradores em 2016, mostraram que o infiltrado inflamatório no SNC também é dependente de resposta de IFN tipo I, pois, enquanto neutrófilos e macrófagos com alta expressão de *IL-1*, *IL-6* e *Cox2* adentram o SNC em animais *IFNAR^{-/-}*, células CD8 expressando *IFN γ* , *GzmB* e *Prf1* são as predominantes a adentrarem o SNC de animais resistentes. Isso é evidenciado pela diferença em neurodegeneração e progressão da doença nestes modelos experimentais¹¹¹.

Além dos demonstrados acima, vários estudos visam a compreensão dos mecanismos pelo quais o ZIKV pode induzir distúrbios neurológicos^{81,113,114}. Células neuronais embrionárias¹¹⁵, como também células da crista neural, que são cruciais no desenvolvimento de ossos do crânio e desempenham um papel importante na formação de cartilagens e nervos, podem ser infectadas por ZIKV. Além disso, promovem o aumento da produção de citocinas de desenvolvimento neurológico, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator inibidor de leucemia (LIF) que iniciam a diferenciação neuronal prematura¹¹³.

As proteínas não estruturais NS4A e NS4B do ZIKV inibem a via Akt-mTOR em células tronco neurais humanas infectadas levando a desregulação de vias de autofagia e neurogênese¹¹⁶. Os genes relacionados à resposta imune adaptativa são negativamente regulados em células de micróglia, sugerindo que ZIKV efetivamente evade a resposta imune após atingir o sistema nervoso central. Como outros vírus, ZIKV desvia os recursos das células hospedeiras e reprograma a maquinaria metabólica para apoiar o metabolismo do RNA viral¹¹⁷.

A placenta atua como uma barreira contra infecções, devido a sua estrutura, células e resposta imune local. Transmissão vertical de agentes infecciosos para o feto pode acarretar em consequências devastadoras. Algumas das causas de mortalidade e morbidade em infecções transplacentária são conhecidas como “TORCH”: *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes*, *Treponema pallidum*, HIV, varicela, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes vírus, entre outros. Mais recentemente, a transmissão vertical do ZIKV também foi adicionado ao grupo de “TORCH”, como revisado em Arora e colaboradores, 2017¹¹⁸.

ZIKV infecta células de Hofbauer e fibroblastos das vilosidades coriônicas da placenta induzindo proliferação e hiperplasia destas^{119,120}. Embora seja induzida a produção de IFN de tipo III (IFN- λ) que seria um fator de resistência às infecções por ZIKV, este não é suficientemente eficaz em impedir a replicação viral⁸¹. Contudo, a infecção por ZIKV pode acarretar baixa atividade placentária, com o aparecimento de trofoblastos apoptóticos, formação anormal de capilares fetais e aumento de eritrócitos nucleados, que são característicos de dano em estrutura placentária⁶².

Ademais, ZIKV pode infectar macrófagos e citotrofoblastos da placenta e, assim, induzir a produção de IFN- α , citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, MCP-1 e genes antivirais tais como RIG-I, MDA5 e LGP2¹²¹. Durante esta infecção, ZIKV estimula a morte celular e a produção dos mediadores inflamatórios que perturbam a barreira placentária acarretando distúrbios neurológicos nos fetos, como a microcefalia⁶². Entretanto, vários podem ser os mecanismos utilizados pelo ZIKV para chegar à placenta e, possivelmente, atravessar a barreira placentária causando danos ao feto, porém, ainda pouco se sabe sobre como o ZIKV pode promover isto.

1.3. Neutrófilos

Neutrófilos são as células mais abundantes no sangue humano e são componentes fundamentais na resposta imune inata. É estimado que 1 bilhão de neutrófilos sejam produzidos por dia por quilograma de massa corporal e durante infecções esse número pode aumentar $10 \times$ ^{122,123}. Embora sejam células de vida-curta com meia vida de 6-8 horas na circulação, estas células podem viver até 42 horas no baço e intestino ou 61 horas na pele^{122,124}.

Os neutrófilos possuem habilidade de infiltrar tecidos rapidamente após um dano ou infecção. O recrutamento para os tecidos ocorre a partir da produção de mediadores inflamatórios e quimioatraentes de neutrófilos. Os principais responsáveis por exercer esta função inclui a citocina IL-8, CXCL2 (MIP2- α)¹²⁵, CXCL5, componente do complemento 5a (C5a), N-formilmetionina (fMLP), fator ativador de plaqueta e leucotrieno B4 (LTB4) que são produzidos por células residentes no local da lesão, como revisado por Williams e colaboradores, 2011¹²⁶. Neutrófilos possuem diversos mecanismos de defesa contra infecções bacterianas e fúngicas e, nos últimos anos, tem

sido demonstrado que estas células também exercem importante papel em infecções virais.

Degranulação é uma das funções efetoras dos neutrófilos. Os grânulos citoplasmáticos podem ser classificados como grânulos primários (azurófilos), secundários, terciários e vesículas secretória. Mais de 1000 diferentes proteínas foram descritas por serem pré-estocadas nestes grânulos¹²⁷. Dentre elas, podemos destacar os peptídeos antimicrobianos como as catelecidinas e alfa-defensina que modulam a produção de citocinas e agem diretamente sobre os patógenos a partir da formação de poros e rompimento de membrana^{128,129}. Elastase de neutrófilos (EN) e mieloperoxidase (MPO), também antimicrobianos, possuem atividade proteolíticas e são importantes na catalização da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)¹³⁰. Catelecidina tem sido demonstrada como importante fator na inibição da infecção por vírus da influenza A (IAV) e sincicial respiratório (RSV)^{131,132}, além disso EN pode ser detectada no soro de indivíduos com bronquiolite aguda causada por RSV¹³³

Estresse oxidativo e produção de ERO são importantes na eliminação de patógenos. ERO pode agir diretamente sobre o patógeno causando danos ou indiretamente por induzir autofagia, pode promover NETose (morte células por liberação de redes extracelulares de neutrófilos – NETs) e morte celular de células infectadas¹³⁴. Foi demonstrado que infecções por JEV induz produção de ERO que está diretamente relacionado com a degradação de partículas virais¹³⁵.

Liberação de NETs é o mecanismo mais recentemente descrito¹³⁶. Composta basicamente por cromatina descondensada e proteínas dos grânulos citoplasmáticos, as NETs podem ser induzidas por diferentes formas. Via NETose, morte dependente da produção de ROS pela NADPH oxidase. Ou podem ser induzidas de forma não fatal para os neutrófilos, não lítica, independente da produção de ROS, e estas ocorrem por exocitose de vesículas contendo proteínas antimicrobianas e DNA nuclear, como revisado por Papayannopoulos em 2018¹³⁴.

As NETs são estruturas com atividade antimicrobiana e com funções de conter a disseminação do patógeno. Tem sido demonstrados que histonas possuem capacidade de neutralizar e promover agregação viral de H3N2 e H1N1 IAV¹³⁷, enquanto que, MPO e defensinas associadas à NETs também podem inibir a infectividade e prevenir a disseminação do vírus da imunodeficiência humana (HIV)¹³⁸. Entretanto, embora a fim

de se eliminar o patógeno, a liberação exacerbada de NET está associada com a obstrução das vias aéreas em infecções causadas por RSV¹³⁹.

Embora todos os mecanismos existentes para a eliminação de patógenos, neutrófilos tem sido descrito como “Cavalos de Tróia” (do inglês, *trojan horses*) em algumas infecções. Como por exemplo em infecções por *Leishmania* e bactérias intracelulares, em que neutrófilos apoptóticos e infectados são fagocitados por macrófagos e, assim, auxilia na propagação da infecção^{140,141}. Neutrófilos também podem auxiliar na disseminação viral, como por exemplo, em infecções por H5N1 IAV em que neutrófilos infectados podem ser encontrados em tecidos placentários¹⁴², e também em infecções por WNV em que foi demonstrado ativa replicação viral no interior de neutrófilos¹⁴³.

Além das funções acima mencionadas, os neutrófilos possuem grande importância na biologia reprodutiva, pela promoção da implantação, modificações do endotélio e até mesmo auxiliando no processo de parto, sendo que defeitos na regulação deste sistema podem acarretar em morbidade e mortalidade materna e fetal (revisado em¹⁴⁴). Estas células transmigram para a placenta após o aparecimento das alterações das moléculas de adesão presentes no endotélio, este efeito é promovido pelas mudanças hormonais que ocorrem durante a gestação¹⁴⁵. Por outro lado, neutrófilos são capazes de promover o recrutamento de outros neutrófilos a partir da produção de IL-17, que induz a liberação de quimocinas e citocinas como IL-6 e MIP-2 por outras células que também recrutam neutrófilos¹⁴⁶.

Vale ressaltar que os neutrófilos possuem importante papel contra infecções virais, como por exemplo em HIV¹³⁸ e JEV¹³⁵. Entretanto, para alguns vírus, estas células servem como veículo para a disseminação viral, como é o caso da influenza H5N1, WNV, citomegalovírus e Epstein-Barr^{142,143,147,148}. A partir disso, especulamos sobre o possível papel dos neutrófilos como “trojan horse” virais na placenta durante a infecção por ZIKV.

1.4. Células T CD8

Células T CD8 são cruciais contra infecções causadas por vírus, bactérias intracelulares, protozoários e, também, câncer¹⁴⁹. Células CD8 naïve continuamente circulam pelo corpo migrando entre sangue, órgãos linfoides e não-linfóides¹⁵⁰⁻¹⁵². Uma

vez que, as células CD8 naíves encontram seu antígeno, elas se proliferam e sofrem várias modificações moleculares que levam a sua diferenciação em células efetoras, as quais são capazes de eliminar patógenos e células tumorais¹⁵³. Entretanto, grande parte destas células, chamadas de células de vida curta (do inglês, *short-lived cells*), morrem por apoptose após a eliminação viral. As células remanescentes que sobrevivem dão origem à células de memória de longa vida¹⁵⁴.

Algumas células CD8 são intrinsecamente capazes de persistirem e gerarem células de memória, estas são as células chamadas de precursoras de memória¹⁵⁵. Estas diferentes populações celulares podem ser distinguidas de acordo com a expressão de alguns marcadores, bem como pela expressão do receptor da IL-7 (CD127) e também do receptor G1 de lectina de células assassinas (KLRG1), sendo as células de vida curtas KLRG1⁺CD127⁻, e as precursoras de memória KLRG1⁻CD127⁺^{156,157}.

Como esperando, a maioria das células T CD8 após infecção por ZIKV polarizam para o perfil de células de vida curta, expressando altos níveis de KLRG1 e baixos de CD127, enquanto que aproximadamente 25% das células CD8 totais apresentam fenótipo de células precursoras de memória. O balanço entre essas duas populações muda e após 100 dias de infecção, aproximadamente 100% das células remanescentes apresentam marcadores de células de memória¹⁰⁸. Vários fatores podem influenciar na diferenciação das células T CD8, dentre eles podemos destacar peptídeos cognato, polimorfismos no MHC-I, a frequência de populações prévias a infecção e as citocinas presentes no microambiente (como comentado por Hickman e Pierson, 2017¹⁵⁸).

Células T CD8⁺ podem controlar infecções virais por vários mecanismos, como pela via dependente de perforina e granzima ou Fas-FasL, que levam à morte celular, ou através da produção de citocinas antivirais, tais como IFN- γ ou TNF- α ¹⁵⁹⁻¹⁶⁴.

As interações entre Fas (CD95) em células alvo infectadas e FasL (CD95L) em células T efetoras e células NK, levam à citólise da célula infectada pela ativação de um domínio de morte seguido da ativação da cascata de caspases da via da apoptose^{161,165,166}. Defeitos tanto em perforina, Fas-FasL ou na via citolítica podem afetar negativamente o controle de vários vírus no SNC, incluindo coriomeningite linfocítica, hepatite murina, e vírus de Theiler¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Para WNV, uma deficiência genética ou adquirida em células T CD8⁺ em modelo experimental resulta em aumento da mortalidade, além de infecção não

controlada e persistência viral no SNC^{170,171}, sendo indispensável à presença de FasL funcional para controlar esta infecção¹⁷².

As células T CD8⁺ citolíticas exploraram o mecanismo de exocitose de grânulos para destruir outras células, uma das funções da perforina é a de facilitar a entrega de granzimas para células alvo¹⁷³. Granzima B ativa a cascata de caspase nas células alvo induzindo a apoptose associada com a fragmentação do DNA¹⁷⁴⁻¹⁷⁷. Estas citolisinas são liberadas precocemente após a sinapse imunológica e a ativação das células T CD8⁺, este processo de degranulação é restrito ao MHC de classe I e específica ao antígeno¹⁷⁸

Alguns fatores de transcrição são importantes para a diferenciação e citotoxicidade de linfócitos T CD8⁺. O T-box dos fatores de transcrição *Eomesodermina* (*Eomes*) e *Tbet* estão relacionados com produção de citocinas como IFN- γ , e à diferenciação de células T CD8⁺ em células efetoras e de memória¹⁷⁹⁻¹⁸¹. A expressão de *Tbet* controla positivamente a regulação de genes associados com as funções efetoras de T CD8⁺, como secreção de perforina, granzima B, β -quimiocinas e IFN- γ ^{182,183}. *Stat5* também auxilia na expressão de genes de T CD8⁺¹⁸⁴, sendo que a ligação de *Eomes* e *Stat5* a regiões cis-reguladoras do gene da perforina aumentam o recrutamento de RNA polimerase para a região promotora deste gene¹⁷⁹. Outro fator de transcrição, o *Runx3*, tem capacidade de regular a expressão de *Eomes*, de *perforina*, *granzima B* e de *Ifn- γ* . Células T CD8⁺ de camundongos deficientes em *Runx3* apresentam baixa expressão dos genes relacionados à citotoxicidade¹⁸⁵.

Todos estes fatores de transcrição estão relacionados à capacidade citolítica de células T CD8⁺ e, até o momento, muito se sabe sobre as funções e o perfil de expressão gênica destas células em respostas a infecções virais, no entanto, o papel e genes envolvidos nas respostas antivirais das células T CD8⁺ reguladoras (CD8⁺reg) ainda são obscuros.

Células T CD8⁺reg têm sido descritas comparadas às T CD4⁺ reguladoras (Tregs), exercendo potente função supressora *in vivo* e *in vitro*¹⁸⁶. Sabe-se que as CD8⁺reg apresentam propriedades similares às Tregs, como a inibição da ativação e proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ dependente de contato célula-célula e produção de TGF- β e IL-10¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Além disso, a atividade supressora de células CD8⁺CD25⁺ pode ser abolida quando se utiliza anticorpos anti-CTLA-4 e anti-TGF- β 1, o que promove a inibição da

expressão de CD25¹⁸⁹. Células CD8⁺reg exercem potente função supressora *in vivo* e *in vitro*¹⁸⁶.

Interessantemente, até 2016 acreditava-se que células CD8⁺reg fossem dependentes de estímulos, induzidas apenas na periferia^{190,191}. Isso devido à baixa expressão de CD28. Entretanto, Vuddamaley e colaboradores (2016) mostraram que células T CD8⁺CD28^{low} já estão presentes no timo e que uma população homóloga com propriedades imunossupressoras também foram identificadas no sangue e timo humano¹⁸⁶. A maior diferença entre as Tregs e CD8⁺reg é a expressão de CD28; Tregs expressam altos níveis de CD28, o qual é necessário para a interação com a molécula B7, enquanto que CD8⁺reg são negativas para CD28¹⁸⁷.

Amplio espectro fenotípico para as células T CD8⁺reg tem sido publicado. Estas podem apresentar CD122⁺Ly49⁺^{192,193}, CD45RC^{low}¹⁹⁴⁻¹⁹⁶, ser CD28^{-187,197-199}, ou CD25^{+188,198,200,201}, e também CD25⁺CTLA4⁺GITR⁺¹⁸⁸. Entretanto, a expressão de Foxp3 nas células T CD8⁺reg parece possuir papel essencial na regulação da proliferação celular²⁰².

A população de CD8⁺reg mais bem caracterizada é a restrita a Qa-1, uma molécula homóloga a HLA-E em humanos, que apresenta peptídeos para o domínio não hipervariável do TCR inibindo a ativação de células CD4⁺^{203,204}. Por outro lado, CD8⁺reg e Tregs também suprimem a resposta imune restrita ao MHC. Células CD8⁺CD28⁻ humanas são restritas ao MHC-classe I, enquanto que CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺, são restritas ao MHC-classe II¹⁸⁷. Entretanto, estudos mostram que o mecanismo pelo qual células CD8⁺CD28⁻ medeiam a supressão da resposta imune ocorre via “APC bridge”, ou seja, à partir da regulação de receptores inibitórios parecidos a imunoglobulinas (ILT) em células dendríticas, monócitos e células endoteliais, promovendo um perfil tolerogênico nestas células²⁰⁵⁻²⁰⁷, auxiliando em transplantes, doenças autoimunes e infecções.

Células CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ são induzidas durante fase iniciais da infecção pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV), enquanto que, ao mesmo tempo, ocorre diminuição no número de células Tregs. Esta variação da relação entre CD8⁺reg e Tregs é relacionado com a alta carga viral, e diminuição da ativação e proliferação de células T CD4⁺, o que leva ao estabelecimento da infecção crônica. Portanto, células T CD8⁺reg podem ser utilizadas como indicativo de mal prognóstico para o desenvolvimento da doença causada por SIV²⁰⁸.

Contudo, em experimentos utilizando terapia antirretroviral em infecções por SIV, mostrou-se que animais que receberam a terapia apresentam melhor resposta imune contra SIV e baixa prevalência de células T CD8⁺reg, coincidentemente apresentaram preservação dos níveis homeostáticos das células Tregs e, ao mesmo tempo, mantém baixa a carga viral, o que, aparentemente, pode resultar em bom resultado a longo prazo²⁰⁹. Por outro lado, durante a infecção crônica, os efeitos supressivos das CD8⁺reg podem ser benéficos, pois diminuem a ativação imune crônica, o que culmina em menor exaustão do sistema imune²⁰⁸.

Além disso, durante a fase crônica de infecções por citomegalovírus e HIV-1, os linfócitos do sangue periférico de pacientes infectados, normalmente não expressam Foxp3. Entretanto, após estímulo *in vitro*, algumas células passam a ser Foxp3⁺, bem como CD25⁺ e produtoras de IL-2. Isso demonstra que o estímulo, nestes modelos de infecção, é suficiente para induzir o fenótipo parecido ao das células Tregs²⁰². Entretanto, células Tregs são não proliferativas tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, enquanto que, CD8⁺reg apresentam perfil proliferativo²⁰². Interessantemente, células CD8⁺reg específicas para HHV-6 (Herpes vírus humano 6) possui forte atividade supressora sobre células efetoras antígeno-específicas e prejudicam a maturação e função de células dendríticas²¹⁰.

PBMC humano de pacientes com HCV crônico ou indivíduos saudáveis após estímulo *in vitro* com peptídeos de HCV induzem duas populações distintas de células T CD8⁺, uma Foxp3⁻ e outra Foxp3⁺. Células T CD8⁺Foxp3⁺ antígeno-específicas apresentaram marcadores típicos de células Tregs como, atividade supressora, produção de IL-2 e IL-10, e expressão de CTLA4 e GITR²¹¹. O mesmo pode ser observado em estímulo *in vitro* de T CD8⁺ específicas para HIV-1 ou citomegalovírus, as quais passaram a expressar Foxp3 e CD25, além da produção de IL-2²⁰². Entretanto, as células CD8regs também são capazes de produzir IFN- γ , perforina e granzima²¹¹. Embora estas últimas estejam envolvidas em atividade citolítica, vias de perforina e granzima é um dos mecanismos que as células Tregs utilizam no controle da resposta imune^{212,213}.

Em paciente infectado por HIV, a liberação de partículas virais no trato genital feminino, detectadas em exame de lavado cérvico-vaginal, está relacionada com a diminuição de células T CD4⁺, devido à perda das células infectadas, e com o aumento da proporção de células T CD8⁺Foxp3⁺ na mucosa, o que sugere que mulheres com

liberação crônica de partículas virais de HIV pode apresentar um ambiente genital mais imunossupressor que iniba a resposta imune²¹⁴.

Durante a gestação, alta proporção de células T CD8⁺CD28⁻ são encontradas na decídua em comparação ao sangue periférico materno^{215,216}. TCD8⁺reg não são restritas ao MHC-classe I clássico, mas requerem co-estimulação de membros da família de Ag carcinoembrionário (CEA) presentes em trofoblastos no início da gestação. Além disso, T CD8⁺reg expressam marcadores de mucosa CD101 e CD103, e utilizam o gene Vβ9 do TCR, o que possui importante papel na prevenção da rejeição fetal, uma vez que este TCR está relacionado ao fenótipo de regulação²¹⁶. Trofoblastos isolados durante o primeiro trimestre da gestação quando colocados em co-cultura com células T CD8⁺ do sangue periférico induzem um perfil supressor nestas células, expressando CD8⁺CD28⁻CD103⁺²¹⁷.

A citocina IL-6 tem importante função na regulação de células NK, dendríticas, além do número e fenótipo de células T na decídua. Além disso, esta citocina é determinante do tempo do parto e nascimento em camundongos. Quando IL-6 exógena é administrada experimentalmente em animais IL6^{-/-}, estes apresentam restauração do tempo do parto, e parcial restauração do perfil de leucócitos alterados, com 10% de aumento na proporção de T CD4⁺ decidual, e notável aumento de 60% no aumento de T CD8⁺ incluindo CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺²¹⁸. Defeitos na regulação ou diferenciação das células T CD8⁺reg na decídua pode causar danos na placenta e resultar em restrição do crescimento fetal²¹⁵.

Sendo, assim, embora com funções estabelecidas em diversas infecções virais, até o exato momento, nada se sabe sobre o papel das células T CD8⁺ reguladoras durante o curso da infecção por ZIKV.

2. OBJETIVOS

Investigar a biologia de duas populações celulares distintas, linfócitos T CD8 e neutrófilos, e sua participação na resposta imune ao ZIKV.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Parte 1: Neutrófilos na infecção por ZIKV como cavalo Tróia para a disseminação viral

- Demonstrar que ZIKV pode infectar e se replicar no interior dos neutrófilos murinos e humanos;
- Avaliar resposta imune de neutrófilos contra ZIKV;
- Avaliar possíveis diferenças entre a infecção de neutrófilos de animais resistentes (C57BL/6) e susceptíveis (SJL) ao ZIKV;
- Verificar se a infecção de neutrófilos ocorre naturalmente durante a infecção *in vivo* por ZIKV;
- Avaliar se a presença de saliva de *Aedes aegypti* no momento da infecção interfere na viremia;
- Demonstrar se o aumento ou redução de neutrófilos na circulação no momento da infecção pode alterar a viremia dos animais;
- Demonstrar se neutrófilos infectados com ZIKV agem como cavalos de Tróia para disseminação de ZIKV em modelo de ZIKV congênita;
- Verificar presença e fenótipo de neutrófilos presentes em placentas de animais infectados com ZIKV;
- Correlacionar citocinas plasmáticas de indivíduos infectados com ZIKV, CHIK e indivíduos saudáveis.

2.1.2. Parte 2: Células T CD8⁺Foxp3⁺ na infecção por ZIKV e seu papel na supressão da resposta imune.

- Avaliar a progressão da infecção por ZIKV *in vivo* na presença e ausência de células T CD8⁺;
- Avaliar o perfil de mRNA produzido no baço em animais deficientes de T CD8⁺ após infecção por ZIKV;

- Determinar o perfil de citocinas durante a infecção por ZIKV;
- Demonstrar a presença de células T CD8⁺ Foxp3⁺ durante a infecção por ZIKV;
- Caracterizar o fenótipo de células T CD8⁺ Foxp3⁺ naturais ou induzidas por ZIKV;
- Avaliar possível papel das T CD8⁺ Foxp3⁺ na infecção por ZIKV;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Neste trabalho foram utilizados camundongos C57BL/6, SJL, C57BL/6 CD8^{-/-}, C57BL/6 Foxp3.EGFP machos e fêmeas entre 8 a 12 semanas, e animais C57BL/6 IFNAR^{-/-} gentilmente cedidos pelo Professor Luís Carlos Ferreira do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Todos os animais foram mantidos em micro isoladores (contendo no máximo 5 animais) no Biotério de experimentação ou quarentena do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética e Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas e ou Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob os processos 61/2016, 4714050719 e 064/2017.

3.2. Preparo do vírus e infecções

Em todos os experimentos foi utilizado ZIKV isolado brasileiro BeH815744⁶⁴. O vírus estoque foi propagado em linhagem celular C636 (ATCC[®] CRL-1660TM) e titulado em linhagem VERO-E6 (ATCC[®] CRL-1586TM). Para infecções *in vivo*, o vírus foi diluído em PBS estéril e os animais foram infectados via intravenosa com 10² - 10⁶ UFP (do inglês, *Plaque forming units*) de acordo com o experimento. Para infecções *in vitro*, o vírus foi diluído em RPMI1640 (LGC Biotecnologia) comum para os experimentos com células CD8, e RPMI1640 sem vermelho de fenol para os experimentos com neutrófilos, nas concentrações MOI (do inglês, *multiplicity of infection*) 0,1 ou 1 de acordo com os experimentos. Para ensaios com vírus inativado, alíquota do mesmo lote viral utilizado nos experimentos, foi submetida a 60 °C por 2 horas seguindo de 5 ciclos de rápido congelamento e descongelamento para inativação total das partículas virais.

3.3. Unidade formadora de placa (UFP)

A técnica de UFP (do inglês, *Plaque forming units - FPU*) foi utilizada para a quantificação de partículas virais replicantes. Células VERO-E6 (ATCC[®] CRL-1586TM) foram plaqueadas em placas de 24 poços (10⁵ células/poço) com meio DMEM baixa glicose (LGC Biotecnologia) 2% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de

penicilina/estreptomicina e incubadas overnight em estufa de CO₂ a 37 °C para aderência. O sobrenadante de cultura de neutrófilos infectados ou não, foi diluído 10 vezes em diluição seriada e adicionado à cultura por 1h em estufa de CO₂ a 37 °C com meio DMEM baixa glicose sem SFB e sem antibióticos. Após a 1h de infecção, o meio foi retirado e adicionado meio DMEM baixa glicose 2X concentrado (LGC Biotecnologia) com o mesmo volume de Carboximetilcelulose (CMC) 3%, 2% SFB e 1% de penicilina/estreptomicina e incubados em estufa de CO₂ a 37 °C por 5 dias. Após este período, o meio de cultura com CMC foi retirado e as células foram fixadas com Formol 4% por 15 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas e coradas com Cristal Violeta. A quantificação foi realizada levando-se em consideração a diluição da amostra e volume adicionado à placa de acordo com Baer e colaboradores, 2014²¹⁹:

$$Pfu/mL = \frac{\text{média contagem de placas}}{\text{Diluição} \times \text{volume}}$$

3.4. Separação de neutrófilos murinos

3.4.1. Por gradiente de Percoll®

A separação de neutrófilos se deu a partir da retirada de medula óssea de fêmures e tíbias de animais C57BL/6, C57BL/6 IFNAR^{-/-} e SJL em meio HBSS sem cálcio e sem magnésio (LGC Biotecnologia) suplementado com 2% SFB + 1% de penicilina/estreptomicina. Após a coleta da medula óssea, as hemácias foram lisadas e ao pellet celular foi adicionado Percoll® 55%. O gradiente foi montado a partir da concentração de Percoll® 81% na base do tubo, acima deste, foi adicionado Percoll® 62%, e por último a suspensão celular em Percoll® 55% foi adicionado ao topo do gradiente. As células foram centrifugadas a 24 °C a 1200g sem freio por 30 minutos. Após a centrifugação, o anel de células entre os gradientes de 62% e 81%, referente a neutrófilos, foi coletado, levado com PBS e ressuspenso em meio RPMI1640 sem vermelho de fenol (LGC Biotecnologia) 3% SFB + 1% de penicilina/estreptomicina. Para avaliação da pureza, as células foram analisadas em citometria de fluxo de acordo com tamanho e complexidade, além de marcação para Ly6G (Figura 1). O rendimento em todas as separações foi de 70%.

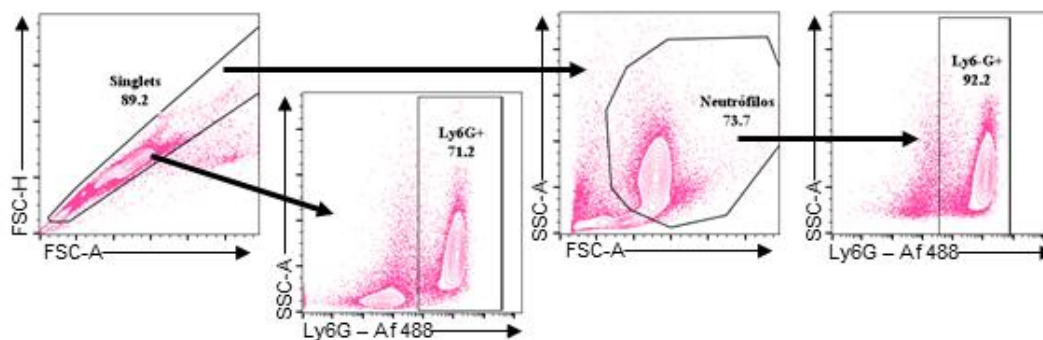


Figura 1: Avaliação rendimento de neutrófilos após gradiente de Percoll. Após o gradiente de Percoll, as células foram lavadas com PBS e marcadas com anticorpo anti-Ly6G alexa-flour 488 e analisadas por citometria de fluxo. Dentro do gate de células únicas (do inglês, *singlets*), células com tamanho e granulosidade referente a neutrófilos foram avaliadas quanto a expressão de Ly6G. Em câmara de Neubauer, utilizando azul de tripan, o número de células vivas foi determinado. De acordo com a frequência (%) de Ly6G⁺ positivo e células vivas, as células plaqueadas para os experimentos *in vitro*.

3.4.2. Por Ficoll-Paque Plus®

O sangue de animais C57BL/6 IFNAR^{-/-} foi coletado por punção cardíaca na presença de EDTA e incubado com 6% de dextran para sedimentação por 30 min a 37 °C. Após esse período, a fase superior foi coletada e transferida para um tubo contendo Ficoll-Paque plus® (GE Healthcare). Células foram centrifugadas a 24 °C 900g por 20 minutos sem freio. O anel de PBMC foi coletado para ZIKV detecção por qPCR, e ao pellet contendo neutrófilos e eritrócitos foi adicionado tampão de lise celular. Ao final, neutrófilos foram ressuspensos em RPMI-1640 sem vermelho de fenol e seguido para posteriores análises para detecção de ZIKV por qPCR.

3.4.3. Por coluna magnética

O sangue de animais C57BL/6 IFNAR^{-/-} foi coletado por punção cardíaca na presença de EDTA. Eritrócitos foram lisados em dois ciclos de lise celular e ao final as células foram ressuspensas em tampão de separação contendo PBS 1x, 2% SFB e 0,05mM de EDTA. Para o isolamento dos neutrófilos foi utilizado o kit de seleção negativa MojoSort *neutrophil isolation kit* (Biolegend®) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, a cada 10⁷ células em 100uL de tampão de separação foi adicionado 10uL do coquetel de anticorpos biotinilados e incubado por 20 minutos em gelo. Após incubação, as células foram lavadas, resuspensas no mesmo volume prévio e *beads* marcadas com estreptoavidina foram adicionadas e incubadas por 20 minutos em gelo. Em seguida, os tubos foram posicionados no interior do magneto Easysep™

(StemCell™ Technologies). Neutrófilos foram recuperados e submetidos à detecção viral por *primeflow*.

3.5. Separação de neutrófilo humano de sangue periférico

Sangue foi coletado em tubos heparinizados após consentimento de voluntários saudáveis. O sangue foi incubado com 6% de dextran por 30 minutos em estufa de CO₂ a 37 °C para sedimentação de hemácias. Após incubação, a parte superior do sangue foi coletada e gentilmente adicionada sobre Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Células foram centrifugadas a 24 °C 900g sem freio por 20 minutos. Após, sobre o pellet de células foi adicionado tampão de lise celular para a lise de hemácias. Ao final, os neutrófilos foram ressuspensos em RPMI-1640 sem vermelho de fenol com 3% SFB + 1% penicilina/estreptomicina. Procedimentos foram aprovados sob o número 86696618.7.0000.5467.

3.6. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

3.6.1. Por DCFDA (*Cellular ROS Detection Assay* - Abcam®)

Para detecção da produção de ERO, neutrófilos foram incubados com o reagente DCFDA (DCFDA - *Cellular ROS Detection Assay* - Abcam®) na concentração de 10µM por 30 minutos, após este tempo, as células foram centrifugadas e o pellet ressuspensado em RPMI sem vermelho de fenol com 2% SFB + 1% de penicilina/estreptomicina em diferentes condições: apenas meio, ZIKV (MOI 0,1), PMA ou ZIKV (MOI 0,1) + PMA (adicionado apenas nos últimos 30 minutos de incubação - 200µg/mL). Após 6h de incubação em estufa de CO₂ a 37 °C, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo Attune® (Thermo Fisher) e analisadas em FlowJo (BD software). A análise foi realizada como mostrado na Figura 2.

3.6.2. Por quimiluminescência

Produção de ERO também foi detectada a partir da oxidação de luminol, como descrito por Hatanaka e colaboradores, 2016²²⁰. Brevemente, neutrófilos (10⁵ células por poço) foram plaqueados em placa branca de 96 poços e incubados nas seguintes condições: apenas meio, ZIKV (MOI 0,1), PMA, ZIKV (MOI 0,1) + PMA ou iZIKV (MOI 0,1) na presença de luminol (1 nmol - Sigma-Aldrich). A oxidação do luminol foi monitorada por quimiluminescência por 3 horas em leitora de microplacas (EG&G

Berthold LB96V, Bad Wildbad, Germany). Resultados foram expressos em unidade relativa de luz (URL) e área sob a curva (ASC).

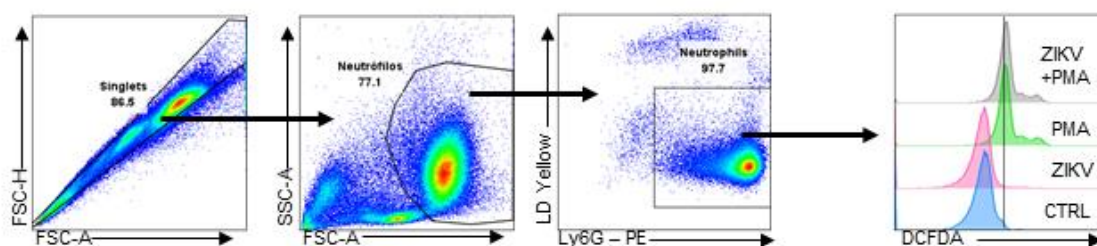


Figura 2: Estratégia de gate da produção de ERO quantificada por DCFDA®. Após 6 horas de infecção os neutrófilos foram lavados, marcados com Ly6G PE e corante de viabilidade (LD yellow) e adquiridos em citômetro de fluxo. Dentro dos eventos únicos, células com tamanho e granulosidade referente a neutrófilos foram selecionadas, e neutrófilos vivos foram posteriormente analisados. A expressão de ERO foi detectada a partir da fluorescência de DCFDA.

3.7. Análise de morte celular

Os neutrófilos foram incubados em três diferentes condições: apenas meio, ZIKV (MOI 0,1) ou PMA (adicionado apenas nos últimos 30 minutos de incubação - 200µg/mL) em RPMI sem vermelho de fenol 2% SFB + 1% de penicilina/estreptomicina em estufa de CO₂ a 37 °C. Nos determinados tempos de incubação, as células foram lavadas com tampão de Anexina 1X e o pellet de células foi ressuspendido em tampão de anexina juntamente com AnexinaV-FITC e 7-AAD de acordo com as especificações do fabricante (FITC Annexin V 7-AAD – BD Bioscience®). As células foram adquiridas em citômetro de fluxo Attune® (Thermo Fisher) e analisadas no FlowJo® (BD software). A análise foi realizada como mostrado na Figura 3.

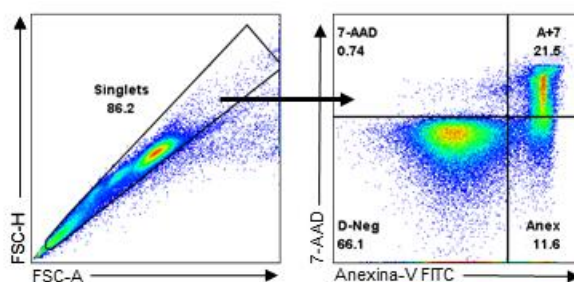


Figura 3: Estratégia de gate dos ensaios de morte celular por anexina-V e 7AAD. Após os determinados tempos de infecção, as células foram marcadas com anexina-V FITC e 7-AAD e analisadas por citometria de fluxo. Células únicas foram avaliadas quanto a marcação para Anexina e/ou 7-AAD. Para o gráfico cinética de morte celular, foi considerado como células mortas (inviáveis) todas marcadas com Anexina (Anex) ou/e 7-AAD e, como células vivas (viáveis), as duplo negativas para as marcações (D-neg). Figura representativa de como os gates foram realizados. A+7, células duplamente marcadas com Anexina-V e 7-AAD. Anex, Anexina-V.

3.8. Ensaio de fagocitose

Neutrófilos de medula óssea de camundongos C57BL/6 e de sangue periférico humano foram infectados com MOI 0,1 por 1 hora. Após este período, as células foram lavadas com PBS 1x e incubadas com Dextran-FITC a 0,5mg/mL por 2,5 horas. Ao final, as células foram lavadas e adquiridas em citômetro Accuri[®] C6 (BD Bioscience) e analisado no software FlowJo[®] (BD Bioscience).

3.9. Imunofluorescência para detecção de NETs

Imunofluorescência foi realizada como descrito por Brinkmann e colaboradores, 2010²²¹. Brevemente, neutrófilos ($2,5 \times 10^5$ células por poço) foram plaqueados sobre lamínulas de 13mm de diâmetro em placas de 24 poços por 1 hora em estufa de CO₂ a 37 °C com RPMI-1640 sem SFB e antibióticos. Após a sedimentação, as células foram infectadas com ZIKV (MOI 0,1) ou iZIKV (MOI 0,1) e incubadas por 1 horas em estufa de CO₂ a 37 °C. Após esse período, foi adicionado PMA (50ng/mL) e incubado por mais 3 horas. Após, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 12 horas e lavadas com PBS. A permeabilização foi realizada com 0,5% de triton X-100 e o bloqueio feito com solução de bloqueio (3% de soro humano AB, 1% BSA e 0,05% Tween 20 em PBS) durante 30 min a 37 °C. As células foram incubadas com anticorpos primários anti-histona H2A/H2B (anticorpo gentilmente doado pelo Prof Arturo Zychlinsky, Instituto Max Planck, Alemanha) e anti-elastase de neutrófilos (Calbiochem, USA) por 1 horas a 37 °C. Após isso, células foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários alexa-fluor 488 e 546 (Invitrogen, USA) por 1 horas a 37 °C. Por último, Hoechst 33342 (Santa Cruz Biotec, USA) foi adicionado e as lâminas montadas com Mowiol e analisadas em microscópio de fluorescência Evos (Thermo fisher).

3.10. Dissociação de placenta murina

Placenta foi dissociada utilizando protocolo adaptado descrito por Arenas-Hernandez e colaboradores, 2015²²². Brevemente, placentas foram coletadas e dispostas em placa de petri contendo 15mL de PBS 1X gelado. Após a coleta de todas as placentas, o PBS foi retirado e as placentas foram cortadas em pequenos pedaços com o auxílio de bisturis cirúrgicos. Os pedaços foram incubados em solução de Accutase (3mL por placenta - Thermo Fisher) a 100RPM por 30 minutos a 37 °C. Após incubação, PBS 1X com 10% FBS e 0,05mM de EDTA foi adicionado e a suspensão de placenta foi filtrada em filtro de 70um e centrifugada a 500g por 5 minutos. Células foram ressuspendidas em

37% de Percoll com RPMI sem vermelho de fenol e centrifugado a 1200g por 20 minutos a 24 °C sem freio. Ao final, as células foram ressuspensas em RPMI sem vermelho de fenol com 10% de SFB e seguida para separação celular (do inglês, *cell sorting*) ou caracterização das populações de neutrófilos da placenta.

3.11. *Cell sorting* de Neutrófilos de placenta murina

A suspensão celular das placentas foi incubada com anti-CD11b-PE (clone M1/70), anti-Ly6G Alexa-fluor 488 (1A8), *live and dead* (Zombie red™ Dye Biolegend) e anti-Fc receptor (CD16/32 – clone 2.4G2) por 30 minutos e ressuspensas em meio RPMI sem vermelho de fenol com 10% SFB e 0,05mM de EDTA e posteriormente submetidas a *cell sorting* em citômetro Moflo Astrios® (Beckman Coulter). A estratégia de gates foi realizada como apresentado na figura 4A. Células Ly6G⁺CD11b⁺ (neutrófilos) e Ly6G⁻CD11b⁺ foram isoladas com pureza variável entre 80 a 96% (Figura 4B).

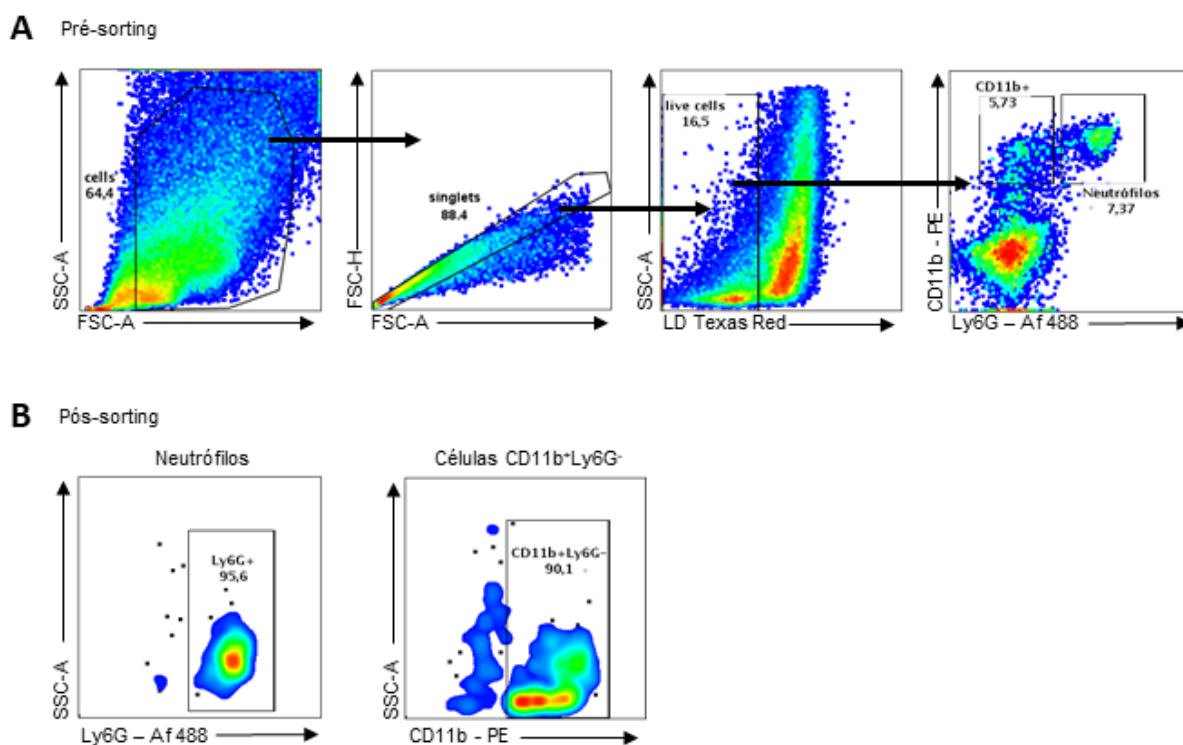


Figura 4: Estratégia de gate para o isolamento de Neutrófilos da placenta por *cell-sorting*. A) Eventos únicos dentro de células com o tamanho e granulosidade referentes a neutrófilos e macrófagos foram avaliadas quanto a viabilidade celular. Dentro do gate de células vivas, células Ly6G⁺CD11b⁺, referentes a neutrófilos, e células Ly6G⁻CD11b⁺ foram selecionadas e isoladas. B) Após o isolamento celular, as amostras foram avaliadas quanto ao rendimento e pureza do isolamento dos neutrófilos e das células Ly6G⁻CD11b⁺.

3.12. Transferência adotiva de neutrófilos

Neutrófilos foram isolados da medula óssea de animais IFNAR^{-/-} por gradiente de Percoll e 2x10⁶ neutrófilos infectados com ZIKV MOI 1 por 2 horas. Após infecção, as células foram lavadas para a remoção das partículas virais e ressuspensas em 100uL de PBS e transferidas via intravenosa para camundongos IFNAR^{-/-} grávidas no dia embrionário (E) 13. Como controle, outros camundongos no mesmo dia de gestação foram infectados com 2x10⁶ UFP de ZIKV via intravenosa. Vinte e quatro horas após infecção ou transferência de neutrófilos infectados, os animais foram eutanasiados e baço e cérebro das mães, cabeça, corpo e placenta dos fetos foram coletadas e seguidas para a detecção de RNA viral por RT-qPCR.

3.13. Tratamento com Filgrastim

Camundongos IFNAR^{-/-} machos entre 6 e 10 semanas foram tratados com 140ug/kg de Filgrastim (Filgastrine rHu G-CSF – Blau Farmacêutica S.A.), diluído em solução de 5% de glicose, via intravenosa. Dois dias após o tratamento, os animais foram avaliados quanto ao aumento do número de neutrófilos utilizando hematocitômetro. Após confirmação do aumento de neutrófilos, os animais foram infectados com 10⁶ UFP de ZIKV via intravenosa. Vinte e quatro horas após, os animais foram eutanasiados e o cérebro, baço e fígado foram coletados para a detecção de RNA viral por RT-qPCR. O Sangue foi coletado e neutrófilos e células mononucleares separadas por Ficoll. Soro, neutrófilos e mononucleares foram seguidos para detecção viral por RT-qPCR.

Animais IFNAR^{-/-} no dia E13 de gestação foram tratadas com 140 ug/kg de Filgrastim, diluído em solução de 5% de glicose, via intravenosa. Dois dias após o tratamento, os animais foram infectados com 10⁶ UFP de ZIKV via intravenosa. No dia do nascimento, os filhotes foram eutanasiados e o cérebro, baço e fígado foram coletados para quantificação viral por RT-qPCR. Cérebro, baço e fígado das mães foram coletados e seguidos para a detecção viral por RT-qPCR. O Sangue foi coletado e neutrófilos e células mononucleares separadas por Ficoll. Soro, neutrófilos e mononucleares foram utilizados para detecção viral por RT-qPCR.

3.14. Saliva de *Aedes aegypt*

Animais IFNAR^{-/-} de 6 a 10 semanas foram infectados via subcutânea com 10⁶ UFP de ZIKV na presença ou não de 10ug de saliva de *Aedes Aegypt*. Vinte e quatro horas

após infecção, a região do inóculo na pele, linfonodo drenante, cérebro e fígado foram coletados para detecção de RNA viral por RT-qPCR. O Sangue foi coletado e neutrófilos e células mononucleares foram separadas por Ficoll. Soro, neutrófilos e mononucleares foram utilizados para detecção viral por RT-qPCR.

3.15. PrimeflowTM RNA Assay - para detecção de Zika vírus adaptado para imunofluorescência

Neutrófilos de medula óssea de animais C57BL/6 e SJL e neutrófilos do sangue periférico de doadores saudáveis foram infectados in vitro com ZIKV MOI 1 e incubados por 20h, após esse período, as células foram submetidas à técnica de primeflow (Thermo Fisher Scientific). Neutrófilo do sangue de animais IFNAR^{-/-} infectados foram isolados e submetidos ao *primeflow*.

Protocolo de primeflow foi adaptado para imunofluorescência em microcâmaras para cultura de células. Brevemente, as células foram fixadas com o tampão de fixação 1 por 30 minutos no escuro e lavadas com tampão de lavagem. Foi adicionado 3x tampão de permeabilização e centrifugado. Após a permeabilização, foi realizada a marcação com o anticorpo 4G2 anti-proteína de envelope viral de flavivírus. Em seguida, as células foram incubadas por 16h (do inglês, *overnight*) em tampão de fixação 2. No dia seguinte, as células foram lavadas e incubadas por 2 horas a 40 °C no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas e incubadas com RNA PreAmp mix por 1 horas a 40 °C seguida de lavagem e outra incubação com RNA Amp mix por 1 hora. Após as células foram incubadas com Label probes por 1 horas a 40 °C, lavadas e as câmeras foram removidas e as lâminas foram montadas com DAPI e as imagens foram adquiridas em microscópio confocal.

3.16. Microscopia eletrônica

Neutrófilos isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram infectados in vitro com MOI 1 por 18 horas. Após, as células foram recuperadas lavadas com PBS e fixadas com Glutaraldeído 4% por aproximadamente 16 horas (do inglês, *overnight*). No dia seguinte, as células foram centrifugadas e o glutaraldeído retirado, sobre o pellet de células foi adicionado PBS e mantido em geladeira até a realização dos passos seguintes para microscopia eletrônica. Para preparo das amostras e aquisição das imagens, as células foram encaminhadas para o serviço de microscopia eletrônica do LIM HC da Faculdade de Medicina da USP. As amostras passaram por etapas de desidratação

com gradiente de acetona, dessecação e metalização com ouro. As imagens foram adquiridas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010.

3.17. Citometria de fluxo para análise de marcadores celulares

3.17.1. Neutrófilos de medula óssea cultivados *in vitro* e *ex vivo* de suspensão celular de placenta

Neutrófilos foram isolados da medula óssea de animais C57BL/6 e infectados por ZIKV MOI 1. Dezoito horas após a infecção, as células foram incubadas com anticorpos anti-MHC-I (clone 34-1-25), anti-MHC-II (clone M5/114.15-2), anti-Ly6G (clone 1A8), anti-CD80 (clone 16-10A1), anti-CD86 (clone GL-1), anti-CD11b (clone M1/70) anti-IFNAR1 (clone MAR1-5A3) e Fc block (CD16/32 clone 2.4G2) por 30 minutos na presença de *live and dead* (Zombie red™ Dye Biolegend). Suspensão celular da placenta também foi incubada com os mesmos anticorpos. Após incubação, as células foram lavadas e fixadas com PFA 1% por 1 hora e lavadas com PBS. Aquisição das amostras foi realizada em citômetro de fluxo Fortessa LSR® (BD Biocience) e análise no software FlowJo® seguindo a estratégia de gates mostrada na figura 5.

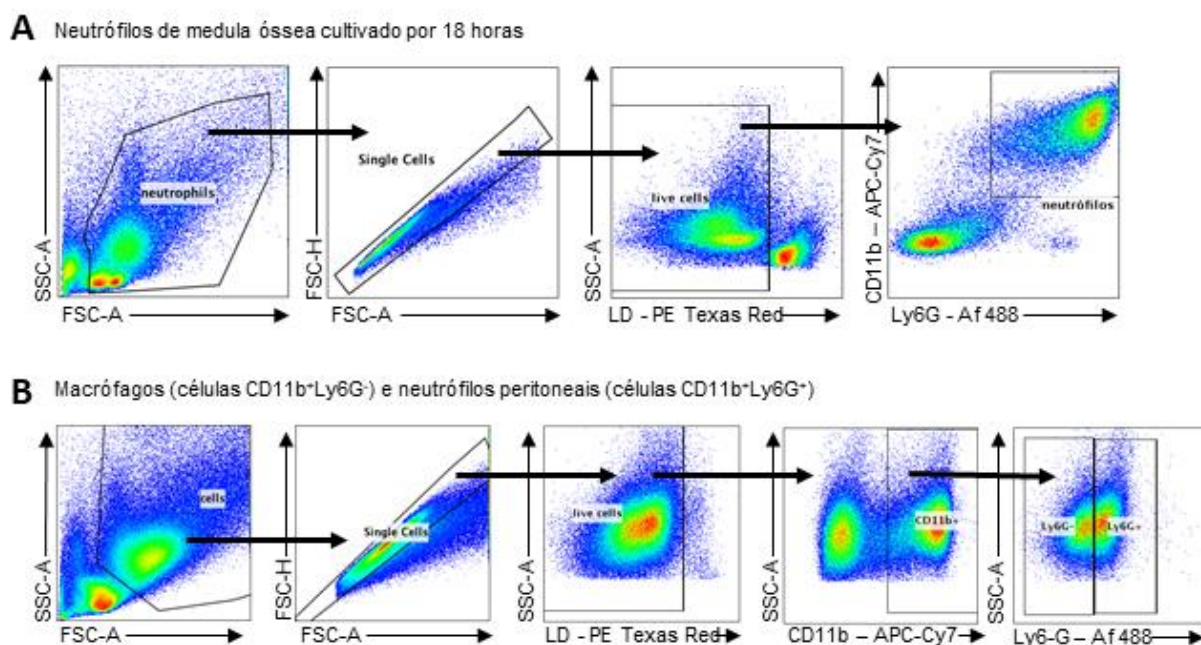


Figura 5: Estratégia de gate para a análise de fenotipagem de neutrófilos. A) Eventos únicos dentro de células com o tamanho e granulosidade referentes a neutrófilos foram avaliadas quanto a viabilidade celular. Dentro do gate de células vivas, células Ly6G⁺CD11b⁺ foram analisadas quanto a expressão de CD80, CD86, IFNAR, MHC-I e MHC-II. B) Macrófagos da cavidade peritoneal de animais infectados 24 horas via intraperitoneal, foram utilizados como controle

positivo para os marcadores analisados nos neutrófilos de medula óssea infectados *in vitro*. Células duplas e mortas foram excluídas e células CD11b⁺Ly6G⁻ foram selecionadas.

3.17.2. Fenotipagem de células T CD8 reguladoras

Nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 15 após a infecção o baço de animais C57BL/6 *Foxp3*GFP foi coletado e as células dissociadas seguido da lise de hemácias. Posteriormente, células foram incubadas com anticorpos anti-CD8-PE (clone 53-6.7) e anti-CD4-PercP (clone GK1.5) na presença de *live and dead* (Green fluorescent reactive dye - Invitrogen) por 30 minutos. Após, as células foram lavadas e a aquisição realizadas em citômetro Accuri C6[®] (BD Biocience) e análise no software FlowJo[®]. Para análise foi excluído *doublets* celulares e células mortas. A partir de então, células CD8⁺ CD4⁻ foram analisadas quanto a expressão *Foxp3*GFP.

Para as análises de caracterização das células CD8 *Foxp3*⁺, após 15 dias de infecção, o baço de animais C57BL/6 *Foxp3*GFP foi coletado e as células dissociadas seguido da lise de hemácias. Foi realizada a marcação de superfície celular com os seguintes anticorpo: anti-CD4-BV510 (clone GK 1.5), anti-CD8-PE-Cy5.5 (clone 53-6.7), anti-ST2-APC (clone RMST2-2), anti-KLRG1-APC-Cy7 (clone 2F1), anti-CD62L-BV605 (clone MEL-14), anti-CXCR3-BV650 (clone CXCR3-173), anti-CX3CR1-BV711 (clone SA011F11), anti-Ly6C-B786 (clone HK1.4), anti-FasL-PE (clone MFL3), anti-CD127-PE-Cy5 (clone A019D5) e anti-CTLA-4-PE-Cy7 (clone UC10-4B9). Após a incubação as células foram fixadas com PFA 1% por 1 hora e lavadas com PBS. A leitura foi realizada em citometria de fluxo LSRFortessa X-20[®] e análise no FlowJo[®] (BD Biocience). Para análise foi excluído *doublets* celulares e células mortas, a partir de então, células CD8⁺ foram analisadas quanto a expressão *Foxp3*GFP (figura 6A). Porém, para a realização das análises utilizando o plugin tSNE (*t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*) do FlowJo, alguns passos foram seguidos. Primeiro, foi estabelecido quais comparações seriam realizadas – CD8 total CTRL vs. CD8 total ZIKV; CD8 total vs. CD8 *Foxp3*⁺; CD8 *Foxp3*⁺ CTRL vs. CD8 *Foxp3*⁺ ZIKV; CD4 *Foxp3*⁺ vs. CD8 *Foxp3*⁺. Segundo, foi estabelecido quais *gates* deveriam ser realizados para as análises – *gate* em CD8 total (Figura 6A) para: CD8 total CTRL vs. CD8 total ZIKV; CD8 total vs. CD8 *Foxp3*⁺; *gate* em CD8 *Foxp3*⁺ (Figura 6B) para: CD8 *Foxp3*⁺ CTRL vs. CD8 *Foxp3*⁺ ZIKV; *gate* em *Foxp3*⁺ (Figura 6C) para: CD4 *Foxp3*⁺ vs. CD8 *Foxp3*⁺. Terceiro, após determinar os *gates*, as amostras foram tratadas com o plugin “*Down sample*” para reduzir o número da amostragem de cada amostra. Quarto, após a utilização do “*Down sample*”

todas as populações mencionadas acima foram concatenadas e um novo arquivo fcs foi adicionado para a análise. Neste arquivo fcs foram determinados os grupos CTRL e ZIKV. Quinto, o plugin tSNE foi aplicado sobre o arquivo fcs concatenado e as análises apresentadas na sessão resultados.

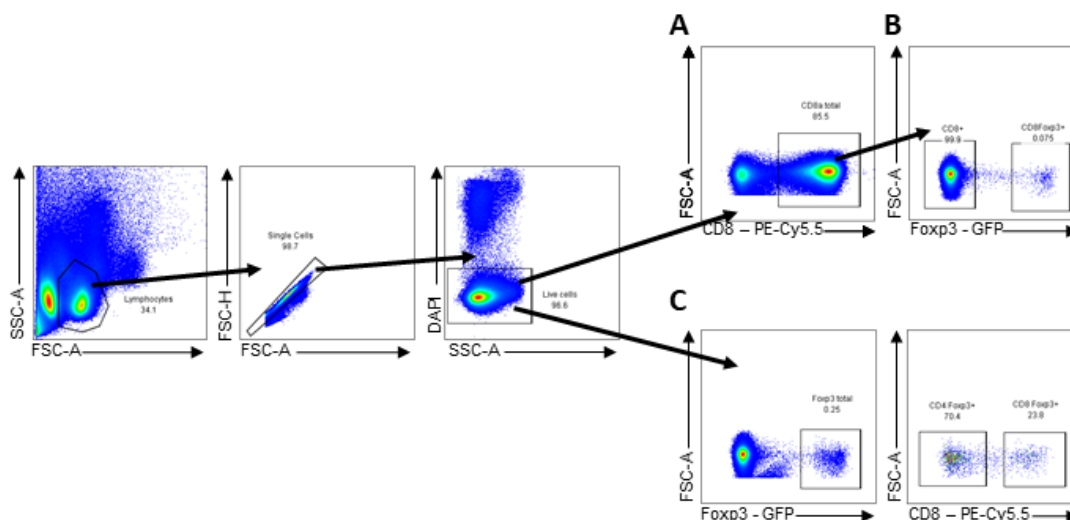


Figura 6: Estratégia de gate realizada para a análise das células T CD8 reguladoras. Eventos duplos e células mortas foram excluídas das análises. **A, B)** A partir das células vivas, células CD8⁺ foram selecionadas e a expressão de Foxp3 analisada. **C)** Células Foxp3⁺ foram separadas de acordo com a expressão de CD8.

3.18. Cinética de infecção

Animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8^{-/-} foram infectados com 10⁶ UFP de ZIKV via intravenosa. Nos dias 1, 3, 5, 7 e 15 após infecção o sangue dos animais foi coletado, centrifugado e o soro foi alíquotado e estocado a -80 °C para posteriores análises, juntamente com cérebro, baço e testículos. A quantificação da carga viral e expressão gênica foram realizadas por RT-qPCR e produção de citocinas por CBA.

3.19. Cell sorting e transferência adotiva de células T CD8

Animais C57BL/6 Foxp3.EGFP foram infectados ou não com 10⁶ UFP de ZIKV via intravenosa. Trinta dias após infecção, o baço e linfonodos foram coletados, macerados em RPMI com 10% de SFB e filtrados em filtro de 70µm e centrifugados. Após, o sobrenadante foi descartado, o pellet celular ressuscitado em tampão de lise celular e incubado por 1 minuto e adicionado meio RPMI. Antes de seguir para o isolamento das células T CD8, foi realizado o enriquecimento destas células utilizando kit de isolamento negativo por coluna de células T CD8 (MagniSort[®] mouse CD8 T cell

- Invitrogen) seguindo especificações do fabricante. Brevemente, as células, no máximo $10^7/100\mu\text{L}$ foram marcadas por 15 minutos em temperatura ambiente com $10\mu\text{L}$ da solução de anticorpos biotinizados. Após, as células foram lavadas com tampão de citometria (HBSS 1x com 3% de SFB e 0,05mM de EDTA) e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente com $10\mu\text{L}$ da solução contendo *beads* magnéticas encobertas com estreptoavidina. Em seguida, os tubos contendo as células foram posicionados no interior do magneto Easysep™ (StemCell™ Technologies) e a solução contendo as células T CD8 foi coletada e lavada para marcação com anticorpos anti-CD8a - PE (clone 53-6.7) e anti-CD4 - PercP (clone GK 1.5) e marcador de morte celular (Zombie red – Invitrogen). Após marcação, as células foram ressuspensas em tampão de citometria e submetidas ao isolamento por *cell sorting* em citômetro FACSAria III cell sorter da BD®.

O isolamento de células CD8 foi realizado dentro da população positiva para CD8 e negativa para marcador de morte celular e, também, CD4. Células positivas para CD8 foram divididas de acordo com a expressão de Foxp3, a partir da detecção da molécula GFP, entre positivas e negativas para Foxp3. Após o cell sorting, 3000 células $\text{CD8}^+\text{Foxp3GFP}^+$ ou 10^6 $\text{CD8}^+\text{Foxp3GFP}^-$ foram transferidas, via intravenosa, para animais C57BL/6 $\text{CD8}^{-/-}$ e 24 horas após, estes animais foram infectados com 10^6 UFP de ZIKV via intravenosa. Vinte e quatro horas após, o sangue e baço destes animais foram coletados e armazenados em -80°C para posterior análise.

3.20. BD Cytometry Beads Array - CBA

Citocinas produzidas no baço e presentes no soro de animais infectados com ZIKV foram quantificadas utilizando o kit de CBA para detecção de citocinas do padrão Th1, Th2 e Th17 (Interleucina (IL)-2, IL-4, IL-6, Interferon- γ (IFN- γ), Fator de necrose tumoral (TNF), IL-17A e IL-10) em camundongos seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, o soro e o macerado do baço foram incubados na presença de *beads* e anticorpos de detecção por 2 horas. Após, as *beads* foram lavadas e ressuspensas em tampão de lavagem e adquiridas em citômetro de fluxo Accuri C6® (BD Biocience) e análise dos resultados realizada no software FCAP Array (BD Biocience).

Citocinas presentes no soro de pacientes infectados por Zika vírus e Chikungunya foram quantificadas utilizando o Kit de CBA para detecção de citocinas inflamatórias (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, o soro dos pacientes e indivíduos saudáveis foram incubados

com as *beads* por 1,5 horas e lavado com o tampão de lavagem. O anticorpo de detecção foi adicionado e incubado por mais 1,5 horas. Por fim, as *beads* foram lavadas e ressuspensas em tampão de lavagem e adquiridas em citômetro de fluxo Accuri C6® (BD Bioscience) e análise dos resultados realizada no software FCAP Array (BD Bioscience) como mostrado na figura 7.

3.21. Extração de RNA

3.21.1. Amostras de cultura de neutrófilos

O mRNA de neutrófilos de experimentos *in vitro* foi extraído utilizando o kit Rneasy® Mini Kit (Qiagen) seguindo especificações do fabricante. Brevemente, tampão RLT foi adicionado ao pellet de neutrófilos, em seguida, foi adicionado o mesmo volume de etanol 70% e todo o volume transferido para a coluna e centrifugado. Após, a coluna foi lavada com RW1 e RPE e o RNA foi eluído com 30µL de água livre de RNase.

3.21.2. Amostras de tecido animal

O mRNA foi extraído utilizando a técnica de TRIzol® (Invitrogen, EUA) seguindo especificações do fabricante. Brevemente, 1mL do reagente TRIzol foi adicionado sobre a amostra. em amostras de tecidos, realizou-se a homogeneização utilizando o equipamento Politron. Posteriormente adicionou-se 500µL de clorofórmio seguido de centrifugação, a fase aquosa foi retirada e transferida para outro tubo e 500 µL de isopropanol foi adicionado. Após 10 minutos em temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Ao pellet, foi adicionado 1mL de etanol 75%, centrifugado e o sobrenadante descartado. Esta última etapa foi realizada 3x para se obter RNA livre de contaminações. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o tubo mantido invertido na bancada até a secagem total do pellet de RNA. Ao final, adicionou-se água ultrapura livre de RNase e a concentração de RNA total foi determinada em NanoDrop (Thermo Fisher) dentro dos parâmetros de 230/260/280nm.

3.21.3. Amostras de soro

Para a extração de RNA do soro foi utilizado o kit de extração QIAmp viral RNA mini (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, tampão AVL foi adicionado em 140µL de soro e homogeneizado por 15 segundos e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos, etanol 100% foi adicionado e todo o conteúdo

transferido para coluna de separação e centrifugado. Após, a coluna foi lavada com as soluções AW1 e Aw2 e o RNA viral eluído com 50µL de AVE.

3.21.4. Após separação celular por *Cell sorting*

Após o *cell sorting* o RNA total das células isoladas foi extraído utilizando o Kit Arcturus™ PicoPure™ RNA isolation (AppliedBiosystems) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, ao pellet de células foi adicionado 100µl de tampão de extração (extraction buffer) e incubado por 30 minutos a 42 °C. Em seguida, foi adicionado 100µL de etanol e todo o volume foi transferido para a coluna e centrifugado. Após, a coluna foi lavada com WB1 e WB2 e, por fim, o RNA foi eluído com 10µL de água livre de RNA.

3.22. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA, foi realizada reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para tanto, 0,5 - 2,0µg de RNA diluído em 10µL de água ultrapura foram adicionados a 10µL de mix (2µL RT buffer, 2 µL de RT random primers, 1µL de multscribe e 0,8µL de dNTPs e 4,2µL de água ultrapura). A síntese de cDNA foi realizada no termociclador da Applied Biosystems seguindo os seguintes parâmetros: 25°C por 10 min; 37 °C por 120 min; e 85 °C por 5 min.

3.23. Quantificação por PCR em Tempo Real

A partir do cDNA obtido, a expressão gênica ou quantificação de material genético do ZIKV foi realizada utilizando a técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR). A cada reação de PCR, foi adicionado a 5µL de amostra, 4,5µL 20x TaqMan® gene expression assay master mix e 5µL de TaqMan® gene expression assay ou Sybr Green®. A reação de PCR foi realizada no aparelho Applied Biosystems QuantStudio3 e submetidas a ciclagens de acordo com o reagente utilizado. As curvas foram normalizadas pela expressão da beta-actina. A expressão gênica foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Fold change), onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra experimental) – ΔCt (amostra controle), e ΔCt é o Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene constitutivo. Resultados em $2^{-\Delta Ct}$ (Relative expression) foram normalizados e apresentados como unidades arbitrárias (UA) para melhor visualização.

- TaqMan primers:

Act β : Mm00607939_g1 FAM

Mertk: Mm00434920_m1 FAM

Ifn β : Mm00439552_s1 FAM

Tyro3: Mm00444547_m1 FAM

Osa: Mm01193955_m1 FAM

Socs3: Mm00545913_m1 FAM

Nos2: Mm00440502_m1 FAM

Eif2 α : Mm01289723_m1 FAM

Axl: Mm00437221_m1 FAM

ZIKA (Lanciotti et al., 2008)²²³

- Sybr Green primers sequence:

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados para a avaliação de expressão gênica por RT-qPCR Sybr.

Gene	Forward	Reverse
Actb	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
Glut 1 (Slc2a1)	CAGTTCGGCTATAAACTGGTG	GCCCCGACAGAGAAGATG
Ifnar2	CTTCGTGTTTGGTAGTGATGGT	GGGGATGATTTCCAGCCGA
Ifna4	TGATGAGCTACTACTGGTCAGC	GATCTCTTAGCACAAGGATGGC
Ifnb1	CAGCTCCAAGAAAGGACGAAC	GGCAGTGTA ACTCTTCTGCAT
Ldha	ACATTGTCAAGTACAGTCCACAC	TTCCAATACTCGGTTTTTGGGA
Tnf	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG

3.24. RT² Profiler PCR Array

Após a extração do RNA, a pureza foi avaliada pela razão A₂₆₀:A₂₃₀ e A₂₆₀:A₂₈₀ por NanoDropTM (Thermo Fisher Scientific) e 2 μ g de RNA foi utilizado para a reação de transcriptase reversa com RT SYBR Green qPCR Mastermix seguindo as especificações do fabricante. Em seguida, 102 μ L de cDNA, 1273 μ L de água DEPC foi misturado com 1375 μ L de 2x RT² SYBR Green PCR e 25 μ L desta reação foi pipetada em cada poço da placa de 96 poços de RT² Profiler PCR Array – *Mouse Innate and Adaptive Immune Response* (Qiagen - Mouse PAMM-052ZA) e submetido a ciclagens para amplificação das sequências de RNA (95 °C por 15 min; 94 °C por 15 segundos; 55 °C por 30 segundos e 70 °C for 30 segundos x 40 repetições) em QuantStudio3 (Applied Biosystems). As curvas foram normalizadas pela expressão de 8 genes endógenos presentes nas placas e a análise foram realizadas na plataforma de análise da Qiagen (<https://geneglobe.qiagen.com/us/>).

3.25. Proteômica

3.25.1. Preparo e digestão das amostras

Após o isolamento, os neutrófilos de placenta foram lizados pelo tampão de lise celular (100mM Tris-HCL pH 8, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% triton). O detergente foi removido, e as proteínas foram digeridas com tripsina usando o protocolo FASP²²⁴. Resumidamente, para cada unidade de filtro YM-10 (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) contendo concentrados de proteína, 200ul de ureia 8M em 0,1 M de Tris/HCl, pH 8,5 (AI) foi adicionado e as amostras foram centrifugadas a 14 000g a 20°C durante 15 min por 2 vezes, e ao final o resíduo no tubo foi descartado, e 100ul de DTT à 8mM foi adicionado ao filtro FASP, e incubados por 15 minutos à 56°C. Logo após, iodoacetamida (0.05M) em ureia (8M) foi adicionado nos filtros e nas amostras, e incubados por 20 min no escuro. Após, os filtros e amostras foram lavados 3vezes com solução de ureia 8M. Ambic 50mM foi adicionado nos filtros contendo o extrato proteico, e centrifugado à 14000g por 10 min por 3 vezes. Por fim, tripsina (Promega, Madison, WI) foi adicionada na proporção de 1:100 e agitado no vortex por 1 min, após isso as amostras foram incubadas overnight à 37°C. No dia seguinte, o filtro foi transferido para um novo tubo de coleta, Ambic 50mM foi adicionado ao filtro e o procedimento de centrifugação foi repetido 2 vezes. O filtrado contendo as proteínas digeridas foram acidificados com ácido fórmico até concentração final de 1% do volume total, bloqueando assim a ação da tripsina. A solução é então completamente liofilizada para a etapa seguinte ou análise por LC-MS.

3.25.2. Análise LC-MS/MS em DIA

Os peptídeos obtidos foram submetidos à um sistema de cromatografia líquida acoplada à um espectrômetro de massas de alta definição Synapt G2-Si (Waters Corp) (LC-MS). A expressão diferencial de proteínas é avaliada com aquisição independente de dados (DIA) através da análise proteômica de *shotgun* pelo modo de configuração de expressão em alta definição (HDMSe). O espectrômetro opera trocando entre baixa voltagem (4eV) e alta voltagem (15-40eV) de energia de colisão nas células de fragmentação, usando um tempo de *scan* de 1,5s com uma faixa de 50-3000 m/z. Todos os espectros são adquiridos em mobilidade Iônica aplicando uma onda de velocidade para separação iônica de 1000 m/s e uma onda de velocidade de transferência de 175 m/s. O processamento através de energia baixa e elevada, adicionado aos dados da massa de referência do peptídeo de referimento ([Glu1] -Fibrinopeptide B Standard, Waters Corp.)

fornece um inventário alinhado no tempo de componentes de tempo de retenção de massa precisos para energia baixa e elevada (EMRT, tempo exato de retenção de massa). Os parâmetros de pesquisa foram definidos como: tolerância automática para íons precursores e para íons filho (20 ppm), mínimo de 3 fragmentos combinados por peptídeo, mínimo de 3 fragmentos pareados por proteína, mínimo de 2 peptídeos combinados por proteína, 2 perdas de clivagem da tripsina, metilação de cisteínas por carbamidol e oxidação de metioninas como modificações fixas e variáveis, taxa de falsos positivos (FDR) do algoritmo de identificação inferior a 1%.

3.25.3. Label-Free Quantificação de Peptídeos e Taxas Proteicas

Cada amostra é executada em três replicadas técnicas. A análise das proteínas diferencialmente expressas é realizada de acordo com Silva JC e colaboradores, 2006²²⁵ e Visser e colaboradores, 2007²²⁶. Os dados contínuos de LC-MS de três replicadas técnicas para cada amostra foram processados para análise qualitativa e quantitativa usando o software Progenesis QI para proteômica (Waters Corp). A análise de expressão é realizada considerando réplicas técnicas disponíveis para cada condição experimental, seguindo a hipótese de que cada grupo é uma variável independente. As identificações proteicas são baseadas na detecção de mais de dois íons fragmentados por peptídeo, e no mínimo dois peptídeos por proteína. A lista de proteínas normalizadas é rastreada de acordo com os seguintes critérios: proteína identificada em pelo menos 2 de 3 execuções da mesma amostra (2 replicadas técnicas) com uma mudança de regulação superior a $\pm 20\%$; apenas proteínas moduladas com $p \geq 0,05$ são consideradas significativas.

3.26. Mapeamento de RNA-seq e análise de expressão genica

Os dados brutos de RNAseq foram obtidos do data set GDE139181 depositados no *Gene Expression Omnibus public databank*. Dados de células CD45⁺ de placentas de mãe saudável e infectada no primeiro trimestre de gestação foram selecionados e comparados. Os dados brutos foram adicionados no Trimmomatic²²⁷, para filtragem de dos dados e remoção das sequencias adaptadoras do Illumina, bases de baixa qualidade (phred score quality > 20), e leituras curtas. Trimming foi seguido pela correção da leitura pelo algoritmo baseado em SGA *k*-mer²²⁸. Em seguida, as leituras foram mapeadas de acordo com o genoma humano de referencia (*Genome Reference Consortium Human Build 38 - GRCh38*) usando o software HISAT2²²⁹ seguindo a otimização previamente descrita²³⁰. A expressão diferencial dos genes foi realizada a partir do número de leituras

de cada transcrito através do HTSeq²³¹. Por fim, os dados de contagem foram submetidos a análise diferencial utilizando o pacote DESeq2 do R²³². Os processos biológicos e ontologia genica foram avaliadas utilizando banco de dados online PANTHER²³³.

3.27. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism* (*Graphpad Software Incorporation*) versão 6. As diferenças entre as médias dos resultados foram determinadas pelo teste *t* de *Student* ou análise de variância (ANOVA), dependendo do número de variáveis. Foi estabelecido como nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Papel dos neutrófilos na infecção por Zika vírus

4.1.1. Zika vírus infecta e replica em neutrófilos de animais C57BL/6 e SJL

Neutrófilos são conhecidos por suas importantes funções em infecções bacterianas e fúngicas e, recentemente, vem sendo demonstrado que os neutrófilos também exercem papel fundamental em infecções causadas por vírus de diferentes famílias, como Flaviviridae, Togaviridae, Orthomyxoviridae e Retroviridae^{125,142,143,234-236}. No entanto, neutrófilos podem apresentar funções opostas frente a diferentes vírus, podendo agir no controle e eliminação viral^{138,143,237}, ou servindo como reservatório para a replicação e disseminação viral^{142,143,235}. Aqui, avaliamos se o ZIKV é capaz de infectar neutrófilos e, se este, possui capacidade de suportar a replicação viral.

Com o intuito de avaliarmos se ZIKV infecta neutrófilos, a medula óssea de animais C57BL/6 foi coletada, e a população de neutrófilos foi isolada e incubada na presença de ZIKV MOI 1 por 20h seguida de análise por Primeflow. Foi possível confirmar que ZIKV infecta neutrófilos, a partir da detecção da proteína de envelope viral pelo anticorpo 4G2, e material genômico e anti-genômico viral (g e agRNA). Interessantemente, a partir da presença da fita anti-genômica do ZIKV (agRNA) é possível inferir que o vírus ativamente se replica no interior dos neutrófilos (Figura 7A).

Além disso, corroborando os resultados acima, foi possível detectar partículas virais infectivas no sobrenadante das culturas de neutrófilos infectados por ZIKV (Figura 7B) e material genético viral foi detectado no interior dos neutrófilos por qPCR (Figura 7C), mostrando que neutrófilos são capazes que comportar a replicação e liberação de novas partículas virais.

A liberação de partículas virais no sobrenadante cumpre uma cinética com pico de liberação logo após 6h de infecção e redução com o passar do tempo (Figura 7B), consistente com a progressiva morte celular observada (Figura 7D). Como esperado, neutrófilos são células de vida curta e, portanto, com 18h em cultura, aproximadamente 50% das células ainda estão viáveis, e em 48h, 100% dos neutrófilos estão mortos. Aqui, também, mostramos que a infecção por ZIKV não altera a meia-vida dos neutrófilos (Figura 7D).

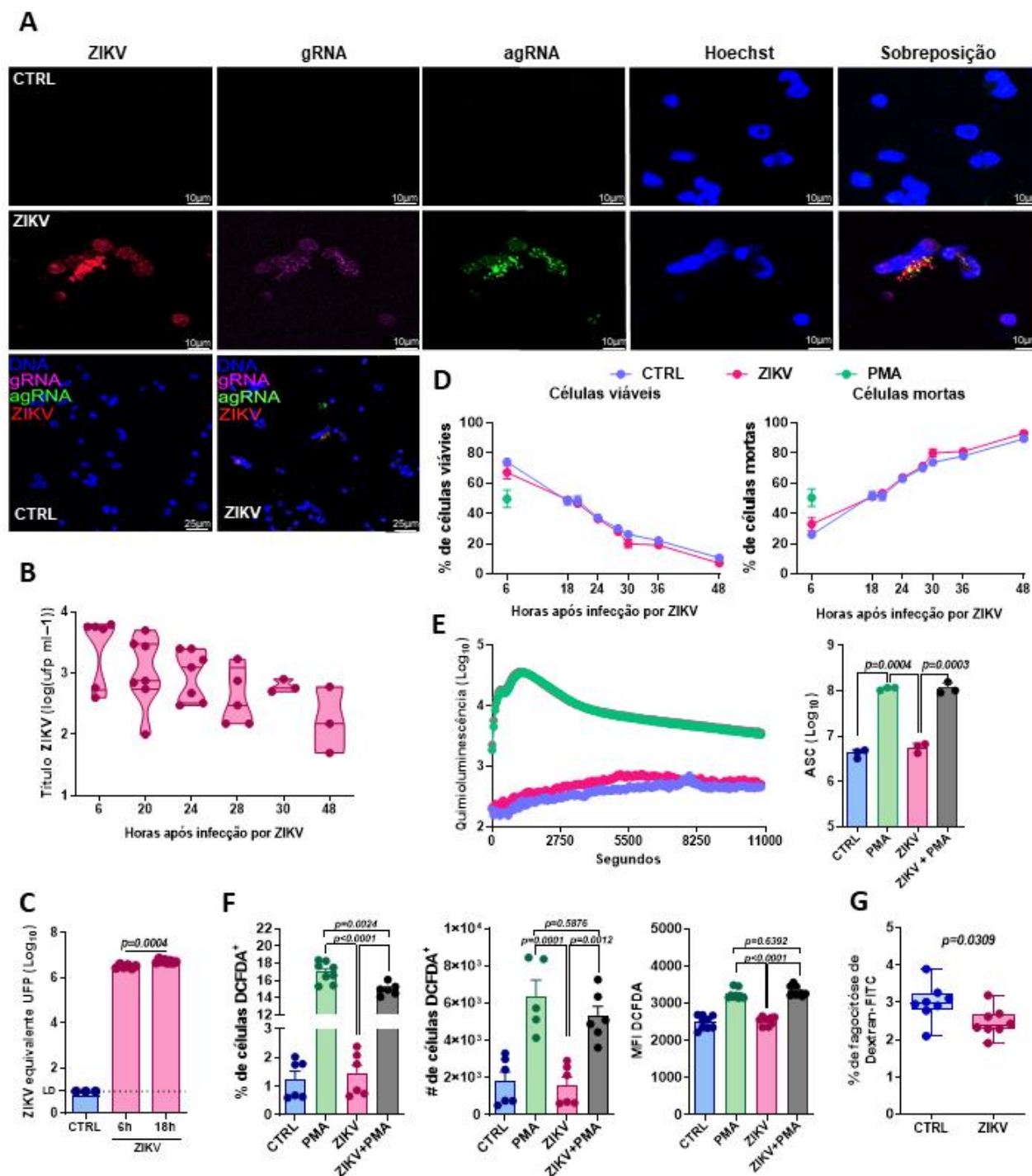


Figura 7: Zika vírus infecta neutrófilos de animais C57BL/6. **A)** Primeflow para detecção de RNA viral. Neutrófilos de medula óssea de animais C57BL/6 foram infectados com ZIKV por 20 horas e submetidos a marcação por Primeflow para RNA genômico (gRNA - lilás) e anti-genenômico (agRNA - verde) de ZIKV e marcação para envelope viral utilizando 4G2 (ZIKV - vermelho). As células foram analisadas por microscopia confocal, objetiva de 63x de magnificação e aumento de 3x. **B)** Quantificação por unidade formadora de placa (UFP) de ZIKV de sobrenadante de cultura de neutrófilos infectados nos determinados tempos. **C)** RT-qPCR para detecção de RNA viral. Nos tempos de 6 e 18 horas de infecção o RNA total foi extraído e o número de cópias virais foi quantificado por qPCR (LD – limite de detecção). **D)** Morte celular de neutrófilos controles e infectados por ZIKV foi determinada utilizando Anexina-V e 7-AAD

nos determinados tempos. **E-F)** Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) foi quantificada por duas diferentes técnicas. **E)** Oxidação de luminol e detecção por quimiluminescência em tempo real por 3 horas. Gráfico da quantificação de ROS durante o tempo (à esquerda) e gráfico de área sob a curva (à direita). **F)** Detecção de ERO por citometria de fluxo a partir da oxidação da sonda DCFDA. PMA foi adicionado à cultura nos últimos 30 minutos de incubação. **G)** Ensaio de fagocitose. Neutrófilos foram infectados com ZIKV por 1 hora e posteriormente incubados com Dextran-FITC por 2,5 horas. Após a incubação, a taxa de fagocitose foi avaliada por citometria de fluxo. Em todas as análises PMA (50nM) foi utilizado como controle positivo. Dados representativos de pelo menos 3 experimentos com 3 replicadas. One-way anova ou t-test foram usados nas análises estatística.

Uma vez que neutrófilos são infectados por ZIKV, avaliamos se esta infecção induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Produção de ERO foi avaliada em tempo real por 3h em neutrófilos infectados, controles e tratados com PMA. Diferentemente dos tratados com PMA, que produzem altos níveis de ERO logo nos primeiros segundos de análise, neutrófilos infectados com ZIKV produzem baixíssimos níveis ERO equivalente ao produzido pelo grupo controle (Figura 7E). Utilizando diferente metodologia, observamos que mesmo após 6 horas de infecção, neutrófilos infectados com ZIKV não produzem ERO (Figura 7F).

Avaliamos também se a infecção por ZIKV poderia alterar algumas funções dos neutrófilos, tais como produção de ERO e fagocitose. Neutrófilos foram infectados com ZIKV por 1 hora (Figura 7E) ou 6 horas (Figura 7F) e expostos ao PMA. A infecção por ZIKV parece reduzir a capacidade oxidativa dos neutrófilos após 6 horas de infecção (Figura 7F). Indo ao encontro ao exposto, neutrófilos após 1 hora de infecção por ZIKV também apresentam reduzida capacidade fagocítica (Figura 7G).

O próximo passo foi avaliar se a infecção por ZIKV alteraria o perfil transcricional de neutrófilos e, para isso, células com 6 e 18 horas após infecção foram analisadas. Os genes aqui avaliados foram separados nos grupos referentes a Interferons (*Ifnb1*, *Ifna4* e *Ifnar2* – Figura 8A), genes estimulados por interferon (*Osa*, *Eif2a* e *Nos2* – Figura 8B), genes ligados ao metabolismo celular e resposta imune (*Glut1*, *Ldha* e *Tnf* – Figura 8C) e genes relacionados a receptores de invasão viral (*Axl*, *Mertk*, *Tyro3* e *Socs3* – Figura 8D). Com 6 horas de infecção, nenhuma alteração transcricional foi observada, embora pareça haver uma tendência em redução da expressão do gene de *Glut1*, porém não significativa (Figura 8C). Dezoito horas após infecção os genes de *Ifnb1*, *Nos2*, *Tnf* e *Axl* apresentaram expressão elevada em comparação ao grupo controle e também ao

tempo de 6 horas (Figura 8A – D), como pode ser observado resumidamente no gráfico de Heatmap (Figura 8E).

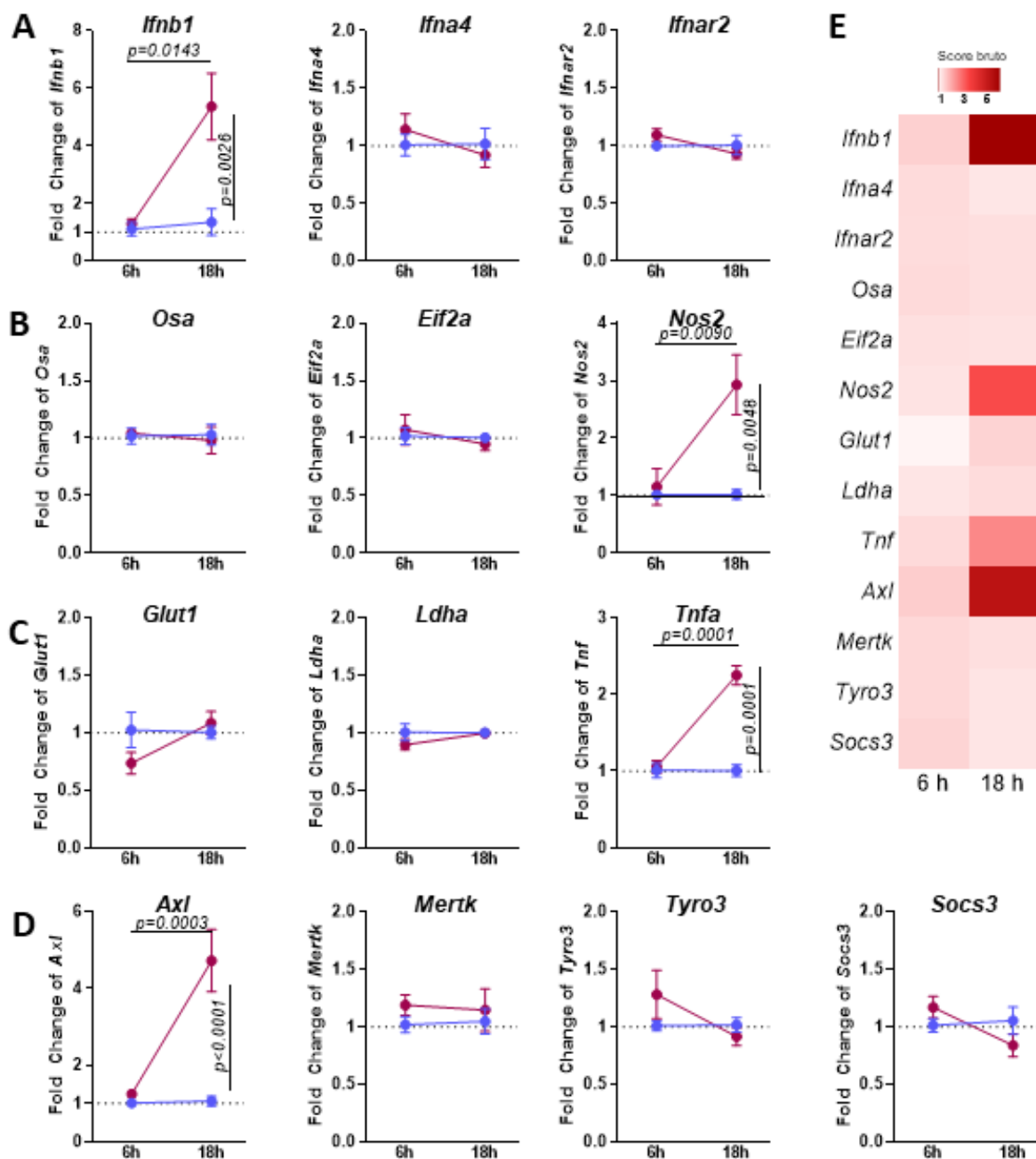


Figura 8: Expressão gênica de neutrófilos infectados com ZIKV. Neutrófilos de medula óssea de animais C57BL/6 foram infectados com ZIKV por 6 e 18 horas. Após, o mRNA das células foi extraído e submetido a síntese de fita complementar (cDNA). O RT-qPCR foi realizado utilizando ambos sistemas Taqman e Sybr Green como determinado nos material e métodos. **A)** genes relacionados a Interferons (*Ifnb1*, *Ifna4* and *Ifnar2*), **B)** Genes estimulados por Interferon (*Osa*, *Eif2a* e *Nos2*), **C)** Genes relacionados a metabolismo celular (*Glut1*, *Ldha* e *Tnf*) e **D)** Receptores TAM (*Axl*, *MertK*, *Tyro3* e *Socs-3*). **E)** Heatmap resumindo a expressão dos diferentes genes nos tempos de 6 e 18 horas. Resultado de 3 experimentos independentes com 3 replicatas. One-way anova e t-test foram utilizados.

Devido ao aumento na expressão do gene de *Ifnb1*, questionamos se neutrófilos seriam responsivos ao possível aumento da produção de IFN tipo 1. Para isso, avaliamos a expressão do receptor de IFN (IFNAR) e de marcadores de ativação células como MHC-I, MHC-II, CD80 e CD86 em neutrófilos infectados com vírus ativo (ZIKV) ou inativado (iZIKV) ou células controles por citometria de fluxo. Macrófagos peritoneais de animais C57BL/6 infectados via intraperitoneal foram usados como controle positivo.

Observamos que tanto a infecção com ZIKV ou iZIKV, neutrófilos expressam baixíssimos níveis de todos os marcadores analisados para ativação celular (Figura 9A - D), inclusive MHC-I (Figura 9C), importante para a apresentação de antígeno. A expressão de IFNAR também não foi alterada após a infecção por ZIKV (Figura 9E). Cogitamos esse fenômeno ser um mecanismo de evasão viral, no entanto, neutrófilos incubados por 18 horas na presença de ZIKV inativado também não altera a expressão de IFNAR comparados ao grupo controle ou ZIKV.

Sabendo-se que animais C57BL/6 são resistentes a infecção por ZIKV, nos questionamos se neutrófilos de animais susceptíveis, como os da linhagem SJL⁶⁴ seriam mais sensíveis à infecção. Seguindo os mesmos protocolos utilizados para neutrófilos de C57BL/6, pudemos observar que ZIKV também infecta neutrófilos de SJL apresentado pela marcação com anticorpo 4G2 anti-proteína de envelope viral e também RNA genômico e anti-genômico (g e agRNA - Figura 10A). A replicação viral foi evidenciada pela marcação para RNA anti-genômico (Figura 10A) e pela detecção por UFP no sobrenadante de cultura de neutrófilos infectados com ZIKV (Figura 10B). A redução na liberação de partículas infectivas durante a infecção das células vai ao encontro da redução da viabilidade celular. Adicionalmente aos resultados encontrados em neutrófilos de animais C57BL/6, ZIKV não induz morte celular (Figura 10C), tão pouco a produção de ERO em neutrófilos provenientes de animais SJL (Figura 10D).

4.1.2. Zika vírus infecta e replica dentro em neutrófilos humanos sem induzir a liberação de NETs

Para corroborar nossos dados em neutrófilos murinos, também avaliamos a infecção por ZIKV em neutrófilos de sangue periférico de indivíduos saudáveis. Observamos que ZIKV também infecta neutrófilos humanos, evidenciado pela detecção com anticorpo 4G2 anti-proteína de envelope e RNA genômico e anti-genômico (g e

agRNA - Figura 11A). Além disso, por microscopia eletrônica foi possível detectar vesículas repletas de partículas virais no citoplasma dos neutrófilos (Figura 11B).

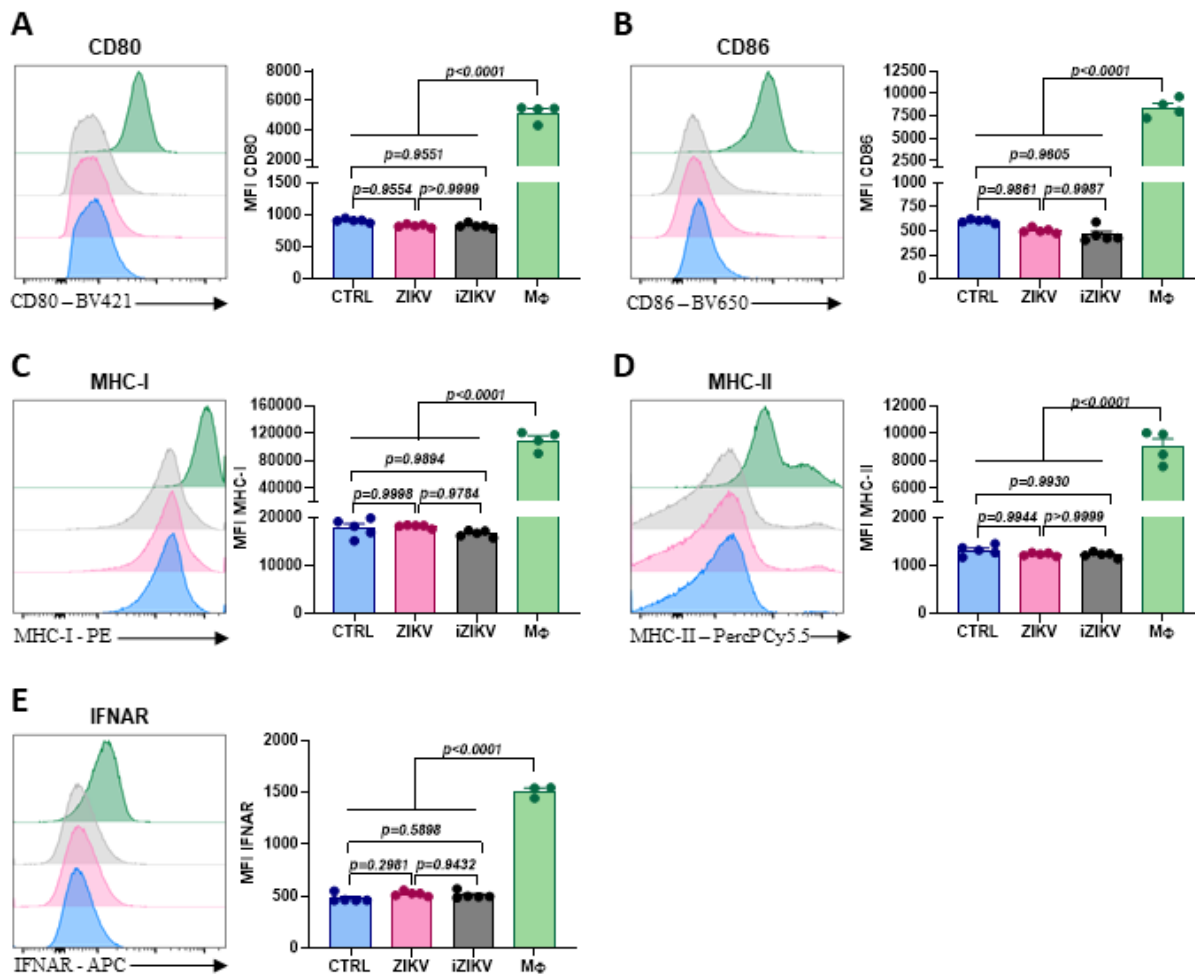


Figura 9: Expressão de marcadores de ativação em neutrófilos infectados com ZIKV *in vitro*. Neutrófilos de medula óssea de animais C57BL/6 foram infectados com ZIKV, incubadas com iZIKV ou apenas meio de cultura por 18 horas. Após esse tempo, as células foram marcadas com A) anti-CD80, B) anti-CD86, C) anti-MHC-I, D) anti-MHC-II e analisada em citometria de fluxo. Macrófago peritoneal de animais C57BL/6 infectados pela via intraperitoneal foram usados como controle positivo para todas as marcações. Dados representativos de pelo menos 3 experimentos com 3-5 replicatas. One-way anova foi utilizado para as análises estatísticas.

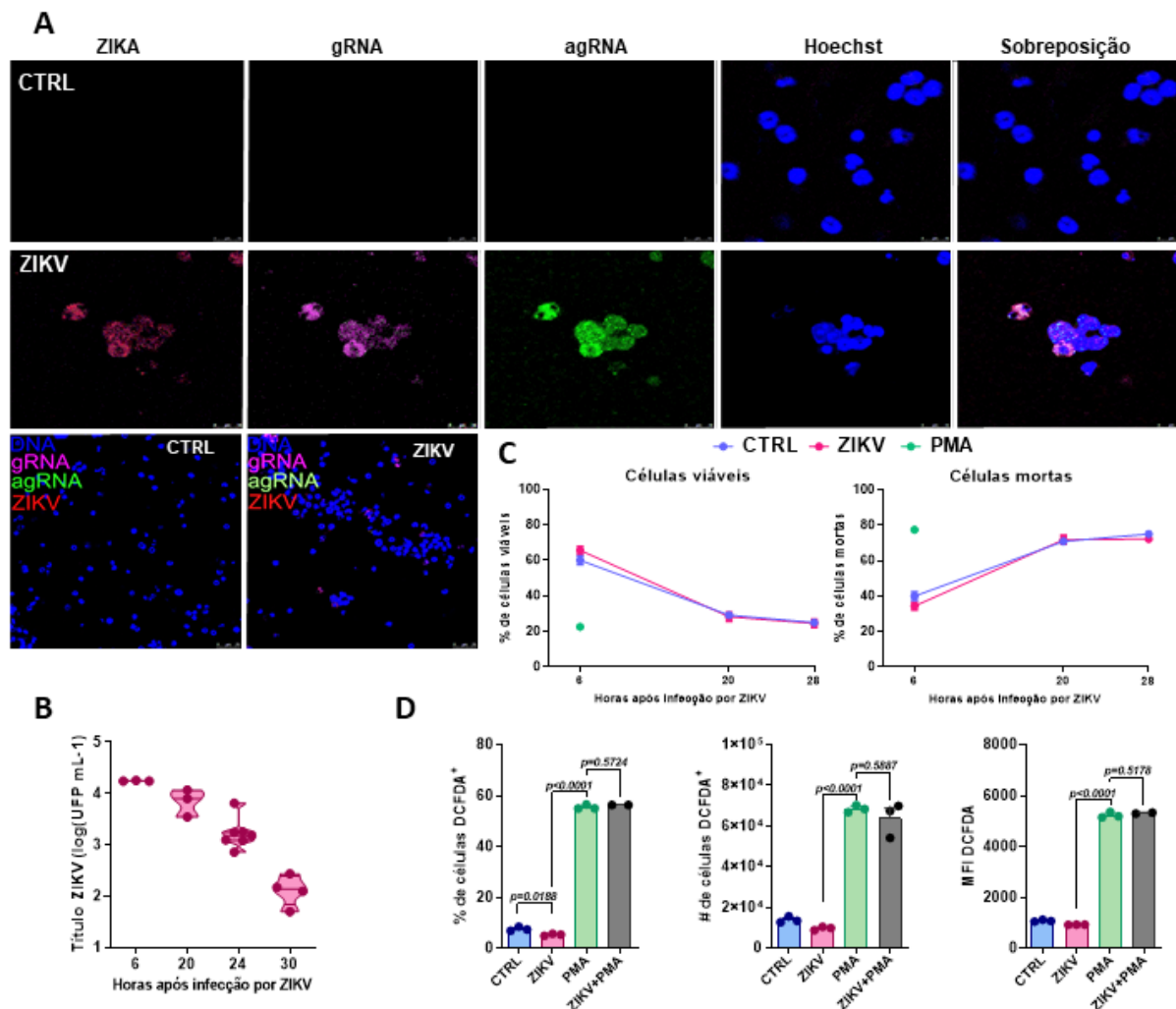


Figura 10: Zika vírus infecta neutrófilos de animais SJL. **A)** Primeflow para detecção de RNA viral. Neutrófilos de medula óssea de animais SJL foram infectados com ZIKV por 20 horas e submetidos a marcação por PrimeFlow para RNA genômico (gRNA - lilás) e anti-genômico (agRNA - verde) de ZIKV e marcação para envelope viral utilizando 4G2 (ZIKV - vermelho). As células foram analisadas por microscopia confocal, objetiva de 63x de magnificação e aumento de 3x. **B)** Sobrenadante de cultura de neutrófilos infectados *in vitro*, foi coletado nos tempos indicados para a determinação de partículas infectivas por UFP. **C)** Neutrófilos foram infectados com ZIKV e incubados nos determinados tempos. Morte celular foi avaliada utilizando o kit de Anexina-V e 7-AAD e adquirido em citômetro de fluxo. **D)** Detecção de ERO por citometria de fluxo a partir da oxidação da sonda DCFDA. Neutrófilos foram incubados com DCFDA e posteriormente infectados ou não com ZIKV ou incubados com iZIKV por 6 horas. PMA foi adicionado à cultura nos últimos 30 minutos e utilizado como controle positivo da produção de ERO e morte celular. Dados representativos de pelo menos 3 experimentos com ao menos 3 replicatas. One-way anova foi utilizado para as análises estatísticas.

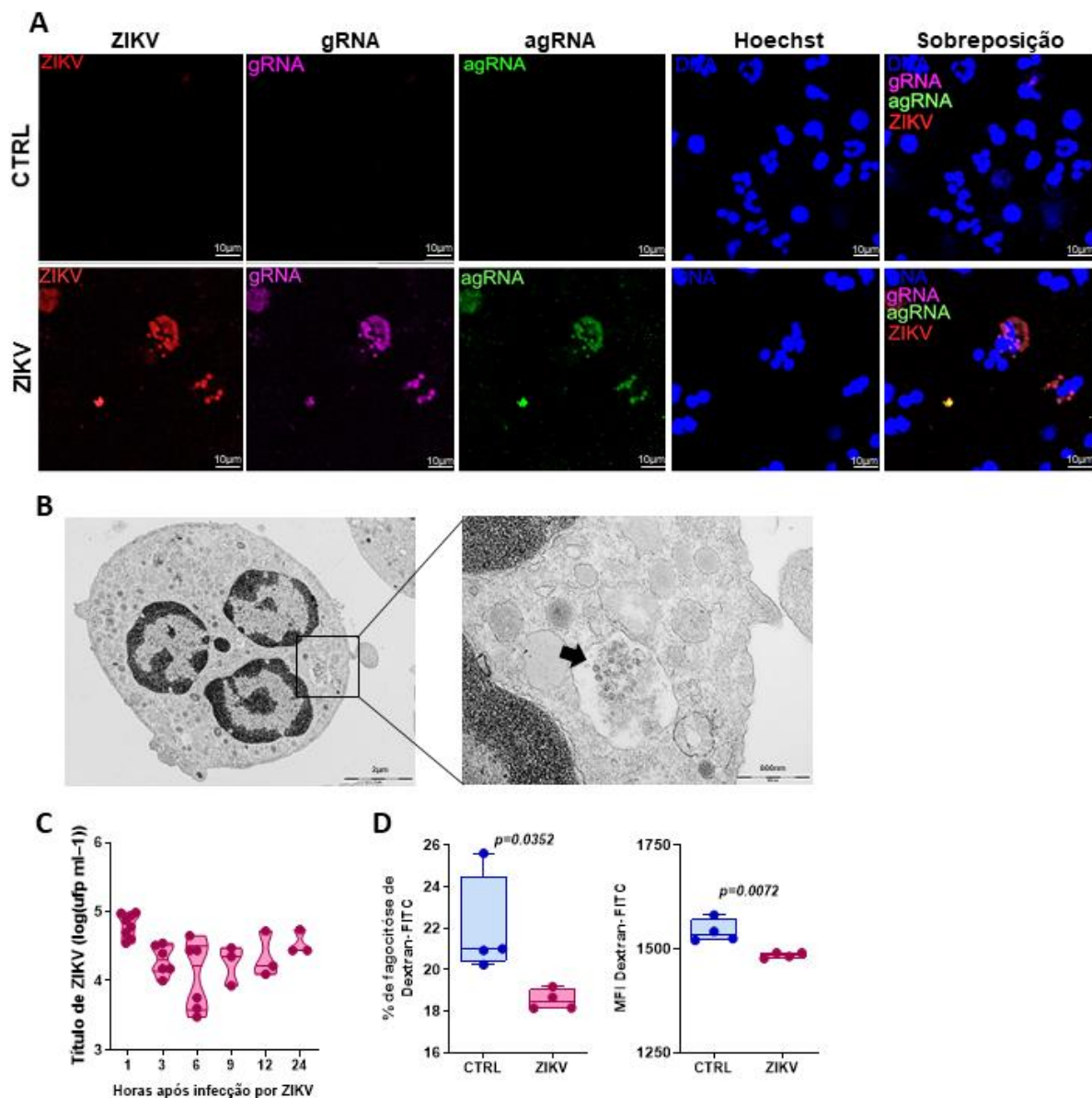


Figura 11: Zika vírus infecta neutrófilos humanos. **A)** Primeflow para detecção de RNA viral. Neutrófilos isolados de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram infectados com ZIKV por 20 horas e submetidos a marcação por Primeflow para RNA genômico (gRNA - lilás) e anti-genômico (agRNA - verde) de ZIKV e marcação para envelope viral utilizando 4G2 (ZIKV - vermelho). As células foram analisadas por microscopia confocal, objetiva de 63x de magnificação e aumento de 3x. **B)** Neutrófilos após 18 horas infectados com ZIKV foram submetidos a microscopia eletrônica. Imagens foram adquiridas com aumento de 8900x (esquerda) e 39Kx (direita) de magnificação. **C)** Quantificação de unidade formadora de placa (UFP) presente no sobrenadante de cultura de neutrófilos infectados com ZIKV nos determinados tempos. **D)** Neutrófilos foram infectados com ZIKV por 1 hora e posteriormente incubados com Dextran-FITC por 2,5 horas. Posteriormente a taxa de fagocitose foi avaliada por citometria de fluxo. Dados representativos de pelo menos 3 experimentos com 3 replicatas. T test foi utilizado para as análises estatísticas.

Como observado por microscopia de imunofluorescência para elastase de neutrófilos (EN), histona H2A/H2B e marcação nuclear com Hoechst, neutrófilos humanos não liberam NETs em resposta a infecção por ZIKV (Figura 12A). A integridade nuclear e dos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos são mantidos após infecção por ZIKV, sendo equivalente ao das células controles (Figura 12A – painel 1 e 2). Diferentemente, células tratadas com PMA, um sabido indutor de NETs, promove exposição e espalhamento característicos de NETs, com histonas H2A/H2B, DNA e EN (Figura 12A – painel 3).

Questionamos se a não indução de NETs seria um mecanismo de evasão viral utilizado pelo ZIKV. Para isso, neutrófilos foram incubados com iZIKV. Foi possível observarmos que as células apresentam as mesmas características dos grupos controle e infectado com ZIKV (Figura 12A – painel 5). Em seguida, avaliamos se a infecção poderia prejudicar a capacidade dos neutrófilos em liberar NETs após estímulo por PMA. A infecção por ZIKV ou exposição ao iZIKV parece reduzir a indução de NETs por PMA por reduzir a marcação H2A/H2B (Figura 12A, painel 4 e 6 e 12B), porém, sem alteração na marcação de EN (Figura 12B).

Embora, neutrófilos humanos produzam maiores níveis de ERO e de forma mais sustentada por até 2 horas e 30 minutos (8250 segundos) em comparação aos neutrófilos de camundongos C57BL/6 (Figura 7E e 12C) estimulados por PMA, quando infectados por ZIKV, neutrófilos humanos também não produzem ERO (Figura 12C). Tampouco, a infecção por ZIKV possuem prejuízo na indução de ERO por PMA.

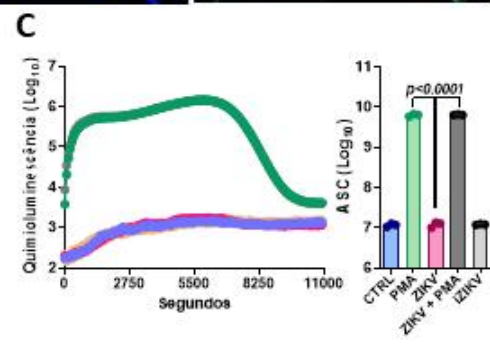
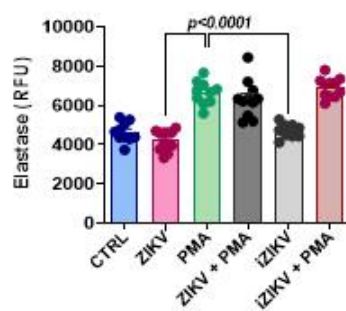
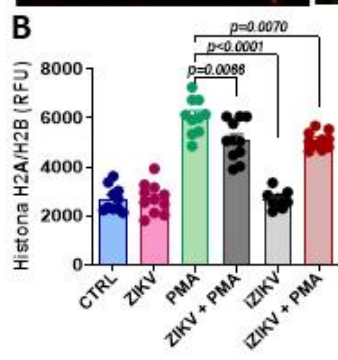
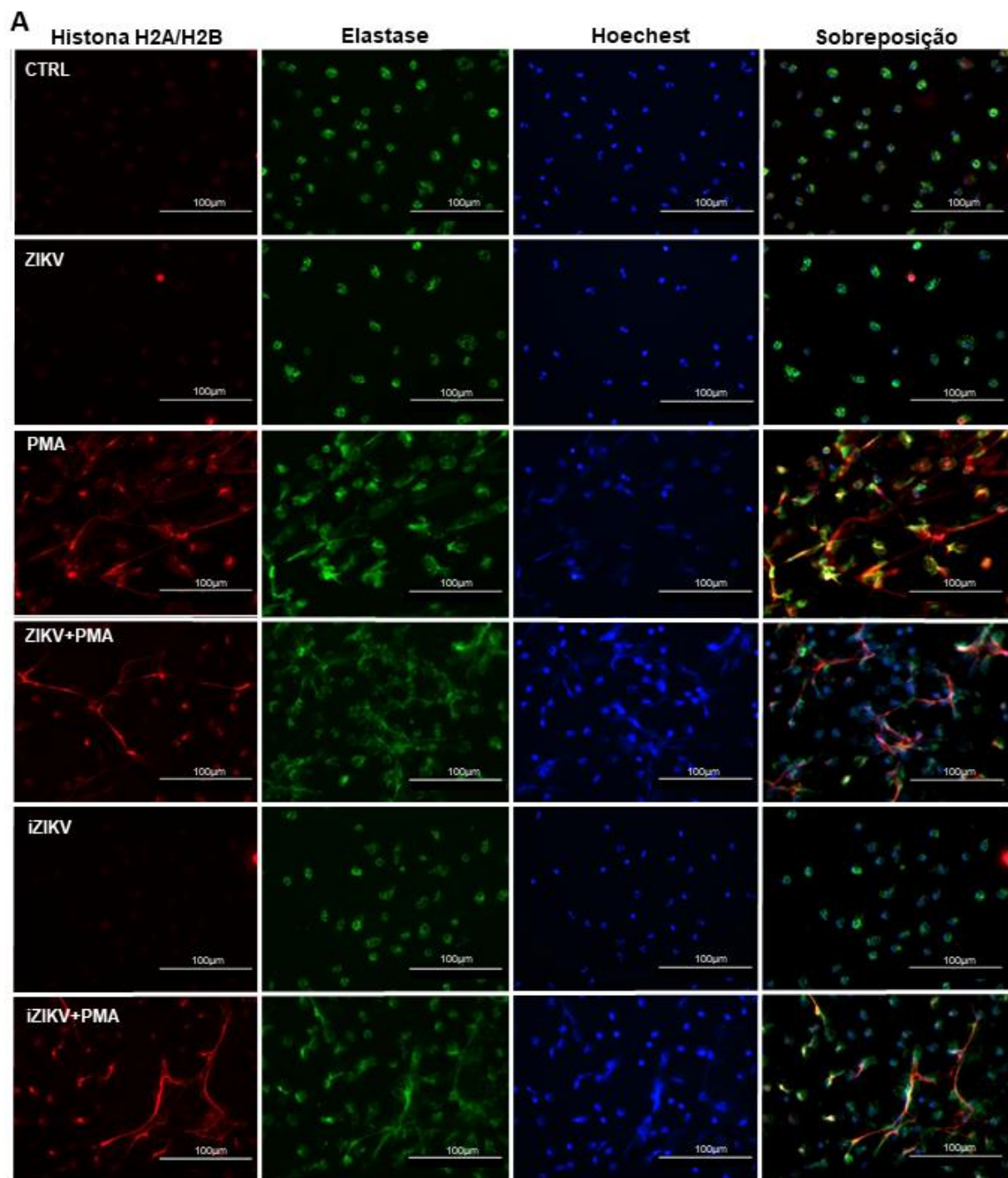


Figura 12: Zika vírus infecta neutrófilo humano sem induzir NETs. **A)** Neutrófilo de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram plaqueados sobre lamínulas e infectados com ZIKV ou incubados com iZIKV na presença ou não de PMA por 4 horas. Após, as células foram submetidas a marcação para imunofluorescência para os seguintes marcadores: histona H2A/H2B (laranja), elastase de neutrófilos (verde) e marcação do núcleo com Hoechst (azul). As células foram analisadas em microscópio de fluorescência Evos®. Imagens foram adquiridas em aumento de 40x. **B)** Quantificação da marcação de histona H2A/H2B (esquerda) e elastase de neutrófilos (direita) utilizando o software ImageJ. **C)** Neutrófilos foram infectados com ZIKV e incubados com luminol. A produção de ERO foi quantificada em tempo real por 3 horas a partir da oxidação do luminol. Gráfico da produção de ERO através do tempo (esquerda) e área sob a curva (direita). PMA (50mM) foi usado como controle positivo para a liberação de NETs e produção de ERO. Dados representativos de 3 experimentos com 3 replicatas. One-way anova ou t-test foram utilizados para as análises estatísticas.

4.1.3. Neutrófilos circulantes infectados por Zika vírus podem ser detectados na infecção experimental

Uma vez demonstrada a capacidade do ZIKV em infectar neutrófilos de diferentes linhagens murinas e também de seres humanos *in vitro*, nos questionamos se os neutrófilos são infectados em modelo de infecção *in vivo*. Para isso, animais deficientes do receptor de Ifn tipo 1 (IFNAR^{-/-}) foram infectados e, após 24 horas, o sangue periférico foi coletado, os neutrófilos isolados e submetidos a detecção de ZIKV por primeflow (Figura 13A). A infecção de neutrófilos e ativa replicação viral *in vivo* foi comprovada a partir da detecção proteína de envelope viral utilizando anticorpo 4G2 e RNA genômico e anti-genômico viral (g e agRNA) no citoplasma dos neutrófilos (Figura 13B). Além disso, foi possível a detecção de RNA viral por RT-qPCR, tanto em neutrófilos, quanto em células polimorfonucleadas do sangue destes animais (Figura 13C). Assim, mostramos por duas diferentes técnicas que a infecção de neutrófilos por ZIKV ocorre durante a infecção *in vivo*.

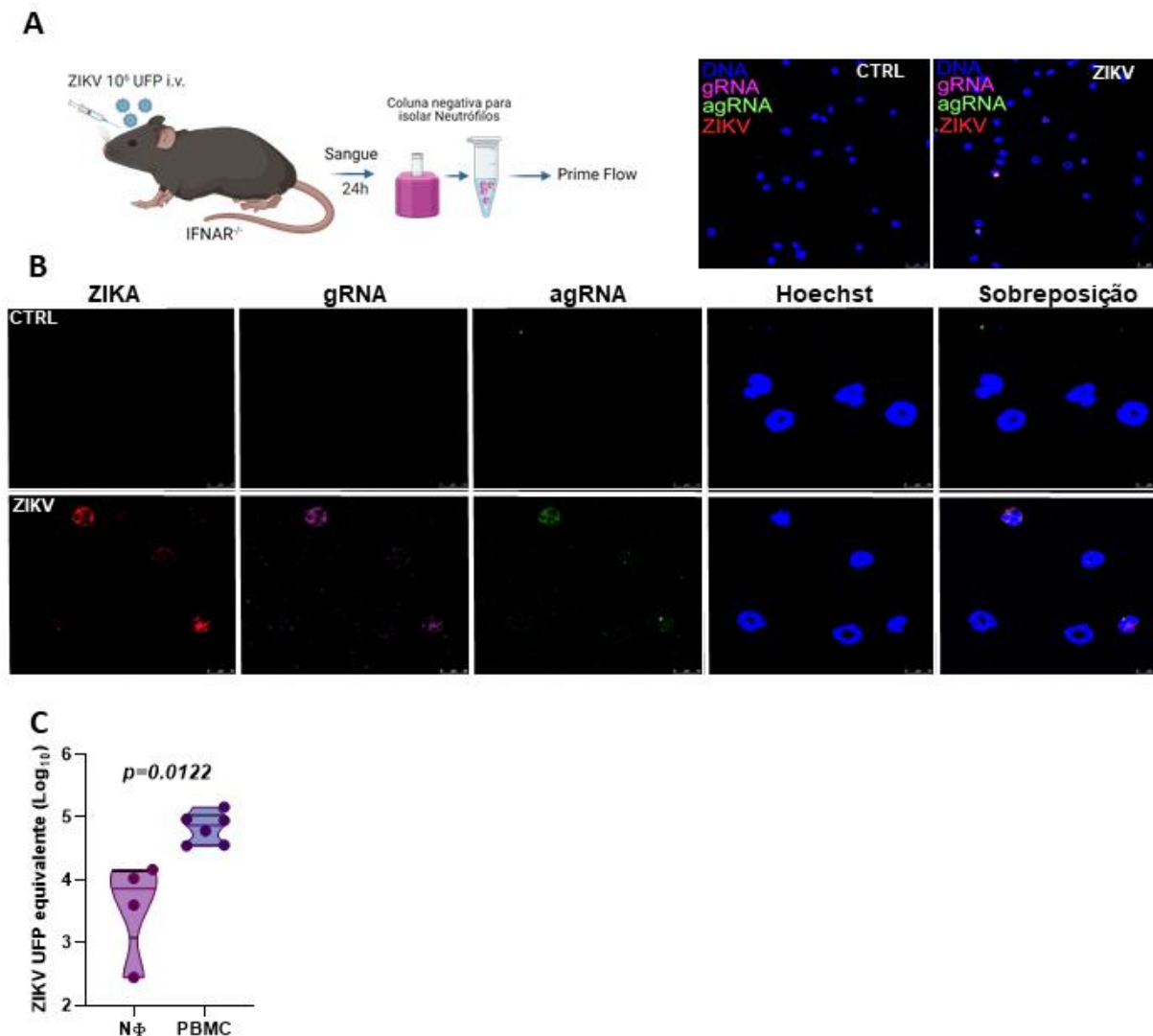


Figura 13: Infecção *in vivo* de neutrófilos em modelo experimental de Zika vírus. **A)** Desenho experimental. Animais C57BL/6 IFNAR^{-/-} foram infectados com 3×10^6 UFP de ZIKV via i.v. Vinte e quatro horas após, o sangue periférico dos animais foi coletado e os neutrófilos isolados por coluna e submetidos a detecção viral por primeflow. **B)** Sequencia genômica (g - roxo) e anti-genômica (ag - verde) do ZIKV. Marcação anti-envelope de ZIKV foi utilizada como controle positivo. **C)** Sangue de animais C57BL/6 IFNAR^{-/-} foi coletado e submetido a separação por Ficoll. Ao final do processo de separação, células polimorfonucleadas (PBMC) e granulócitos (NΦ) foram recuperados e submetidos a detecção de RNA viral por RT-qPCR.

Avaliamos também o perfil de ativação dos neutrófilos de animais C57BL/6 infectados com ZIKV. Diferentemente das células infectadas *in vitro*, neutrófilos peritoneais de animais infectados *in vivo* via intraperitoneal apresentaram altos níveis de CD80 (Figura 14A), CD86 (Figura 14B), MHC-I e II (Figura 14C e D). A expressão de CD80 e CD86 dos neutrófilos infectados foi ainda maior em comparação aos níveis de expressão dos macrófagos da cavidade peritoneal de animais infectados. Por outro lado,

embora com leve tendência, neutrófilos infectados não alteram a expressão de IFNAR corroborando nossos dados *in vitro* (Figura 14E).

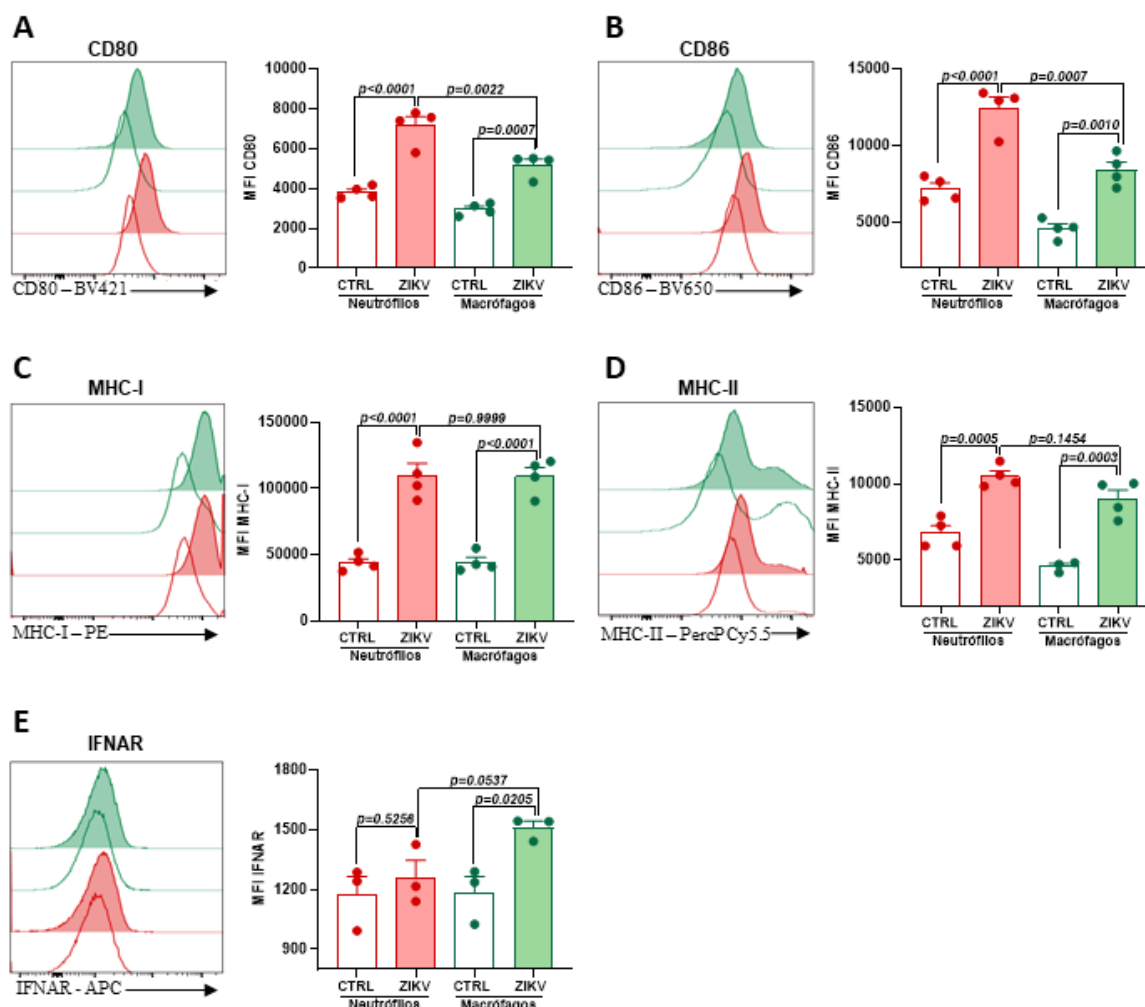


Figura 14: Expressão de marcadores de ativação em neutrófilos peritoneais de animais infectados com ZIKV *in vivo*. Animais C57BL/6 foram infectados com ZIKV via intraperitoneal e após 24 horas o lavado peritoneal foi coletado e submetido a marcação com **A)** anti-CD80, **B)** anti-CD86, **C)** anti-MHC-I, **D)** anti-MHC-II e analisada em citometria de fluxo. Células CD11b⁺Ly6G⁺ foram consideradas neutrófilos, enquanto que células CD11b⁺Ly6G⁻, consideradas macrófagos. Dados representativos de 1 experimento com 3-5 replicatas. One-way anova foi utilizado para as análises estatísticas.

4.1.4. Saliva de *Aedes aegypti* aumenta a infecção por ZIKV

O inóculo do vírus durante a picada do mosquito é um estágio importante nas infecções por arbovírus. O recrutamento de células imunes e a inflamação causada pela picada e saliva auxiliam na infecção, replicação e disseminação do vírus¹²⁵. Como mostrado por Henrique e colaboradores (2019), neutrófilos são as principais células a

serem recrutadas para a pele após a picada do mosquito²³⁸. Como o ZIKV é um arbovírus, nós avaliamos se a saliva de mosquito *Aedes aegypti* poderia facilitar a infecção por ZIKV.

Para isso, animais IFNAR^{-/-} foram infectados na presença ou ausência de saliva de *Aedes aegypti* (Figura 15A). Observamos que, neste modelo, a infecção na presença da saliva não alterou a carga viral na pata (sítio de inóculo – Figura 15B), baço (Figura 15C), cérebro (Figura 15D) e fígado (Figura 15E). Entretanto, quando avaliamos o soro, vimos que na presença de saliva, a viremia foi elevada comparado aos animais infectados com ZIKV (Figura 15F). Quantificamos, também, RNA viral presente nos neutrófilos e células PBMC do sangue destes animais. Em ambos os grupos (ZIKV e Saliva+ZIKV) foi possível detectar vírus tanto nos neutrófilos, quanto nas células PBMC (Figura 15G). Comparativamente, no grupo ZIKV, as células mononucleares possuem maior carga viral comparado aos neutrófilos, enquanto que, no grupo Saliva+ZIKV, essa diferença é reduzida. Corroborando nossa ideia, animais infectados na presença de saliva apresentam maior viremia.

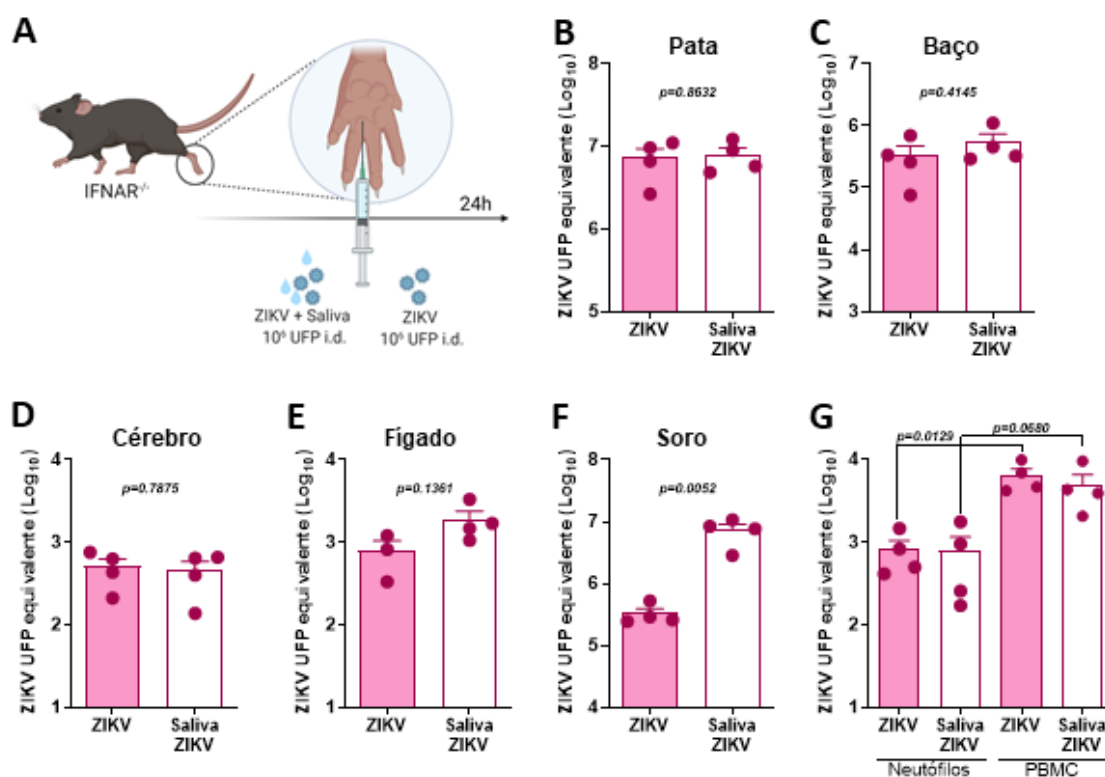


Figura 15: Saliva de *Aedes aegypti* induz o aumento da viremia. A) Desenho experimental. Animais C57BL/6 IFNAR^{-/-} foram infectados via intradérmica com 10⁶ UFP de ZIKV na presença ou não de 10ug de saliva de *Aedes aegypti*. Vinte e quatro horas após, B) pata, C) baço, D) cérebro,

E) fígado, **F)** soro e **G)** neutrófilos e mononucleares do sangue destes animais foram avaliados quanto a carga viral por RT-qPCR. Dados representativos de 3 experimentos com 3-4 replicatas. T test foi utilizado para as análises estatísticas.

4.1.5. Função dos neutrófilos na infecção por ZIKV

A seguir, avaliamos a biologia dos neutrófilos na infecção *in vivo*. Para isso, animais C57BL/6 foram tratados com anticorpo anti-Gr1 para a depleção de células que expressam Ly6G/Ly6C, dentre estas, neutrófilos e monócitos circulantes (Figura 16A). A ausência destas células no momento da infecção acarreta em menor viremia 24 horas após a infecção (Figura 16B). No entanto, quando utilizamos o anticorpo anti-Ly6G (clone 18A), específico para depleção de neutrófilos, ainda observamos uma redução na viremia destes animais, porém não tão acentuada (Figura 16C). Isso nos mostra que, pelo menos no modelo murino, que possui baixa frequência de neutrófilos comparados aos humanos, tanto neutrófilos quanto os monócitos são importantes para a replicação viral logo nas primeiras horas após a infecção.

O contrário também foi testado. Animais IFNAR^{-/-} foram tratados com Filgrastim, um G-CSF recombinante humano (rHu G-CSF) dois dias prévios à infecção por ZIKV (Figura 17A). Vinte e quatro horas após a infecção, observamos elevado aumento da viremia nos animais previamente tratados com rHu G-CSF (Figura 17B), e uma baixa tendência ao aumento da carga viral no cérebro destes animais (Figura 17C). Nenhuma diferença foi detectada no baço, fígado, neutrófilos e PBMCs (Figura 17E - G).

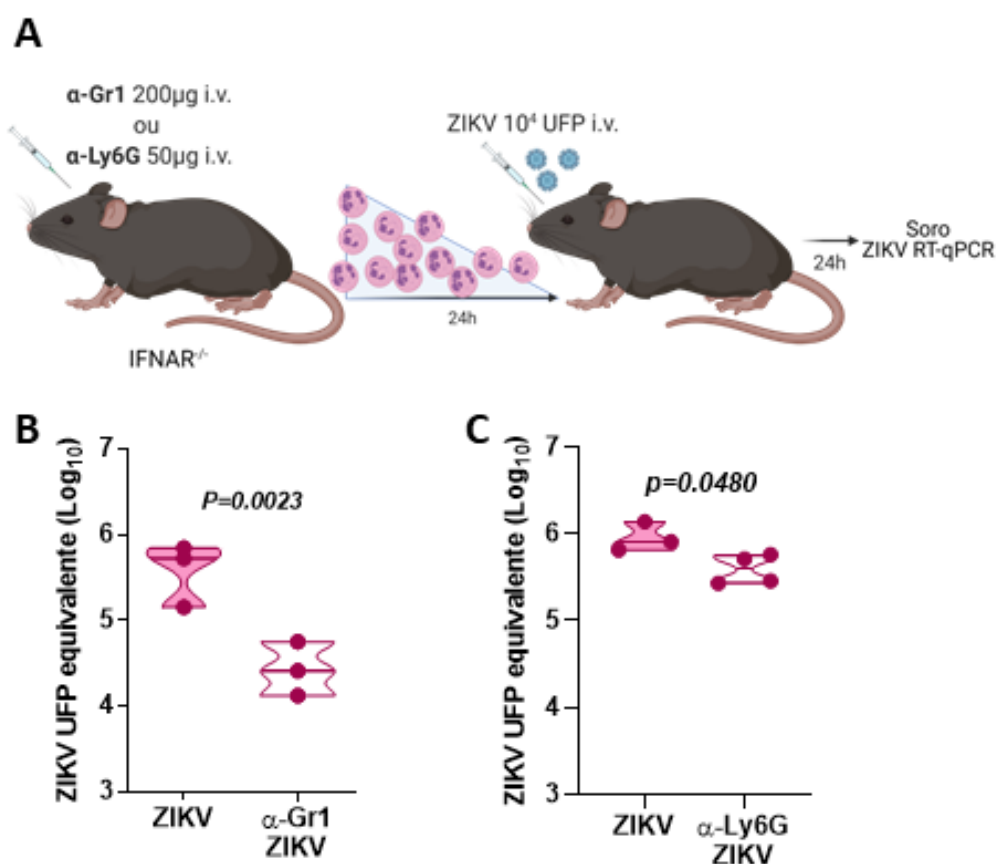


Figura 16: Menor número de neutrófilos nas primeiras horas de infecção resulta em menor viremia. A) Desenho experimental. Animais C57BL/6 IFNAR^{-/-} foram tratados com 200 μ g de anti-Gr1 ou 50 μ g anti-Ly6G via i.v. e 24h após infectados com 10⁴ UFP de ZIKV. Vinte e quatro horas após, foi realizada a quantificação do RNA viral por RT-qPCR no soro. B) Viremia dos animais tratados ou não com anti-Gr1 (α -Gr1). C) Viremia dos animais tratados ou não com anti-Ly6G (α -Ly6G) Dados representativos de 3 experimentos com 3-4 replicatas. T test foi utilizado para as análises estatísticas.

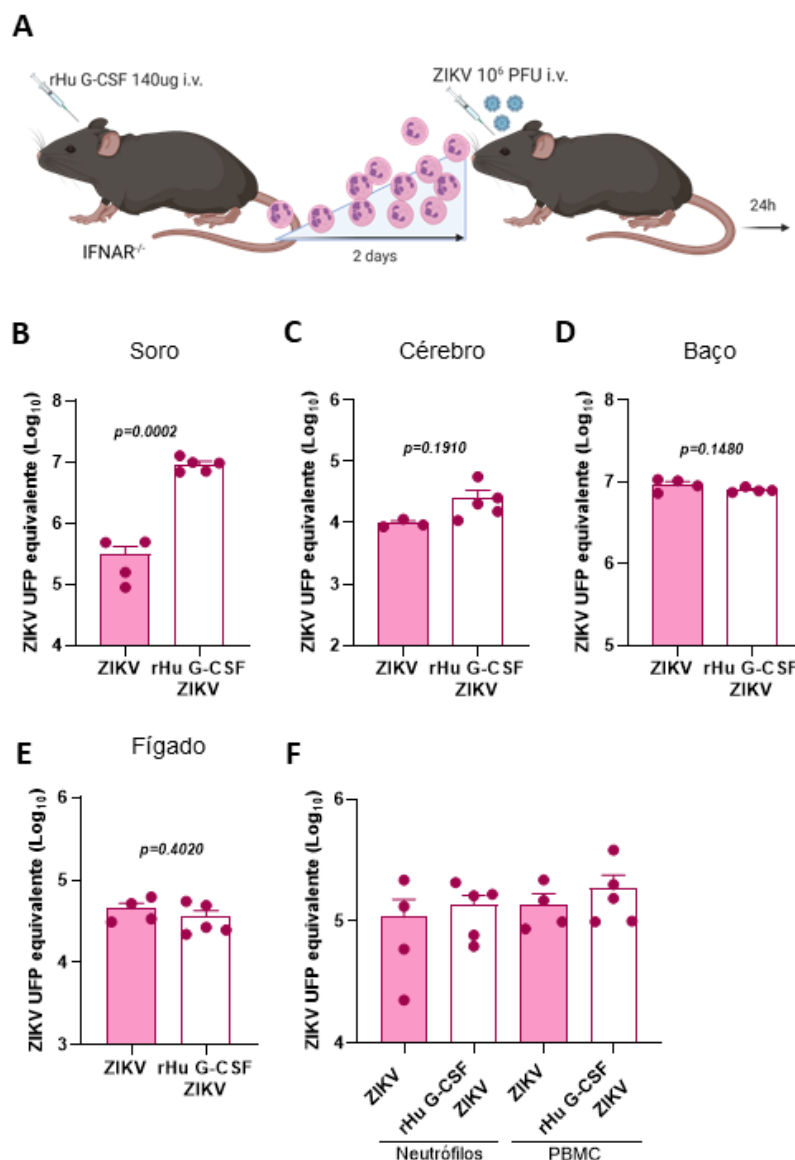


Figura 17: Aumento do número de neutrófilos nas primeiras horas de infecção resulta em maior viremia. A) Desenho experimental. Animais C57BL/6 IFNAR^{-/-} foram tratados com 140µg de rHu G-CSF via i.v. e 2 dias após foram infectados com 10⁶ UFP de ZIKV. Vinte e quatro horas após, foi realizada a quantificação do RNA viral por RT-qPCR no B) soro, C) cérebro, D) baço, E) fígado e G) neutrófilos e mononucleares do sangue. Dados representativos de 3 experimentos com 3-5 replicatas. T test foi utilizado para as análises estatísticas.

4.1.6. Neutrófilos auxiliam na disseminação de ZIKV para os fetos

Uma vez que encontramos neutrófilos infectados no sangue de animais IFNAR^{-/-} infectados, nos questionamos se estas células seriam responsáveis por levar o vírus até a placenta. Para responder esta pergunta, neutrófilos isolados da medula óssea de animais IFNAR^{-/-} foram infectados in vitro com MOI 1 por 2 horas e transferidos para animais IFNAR^{-/-} prenhes no dia gestacional (E)-13 e após 24 horas os tecidos fetais e maternos

foram coletados (Figura 18A). ZIKV foi detectado no cérebro, fígado, medula óssea e baço das mães que receberam neutrófilos infectados *in vitro* com ZIKV (Figura 18B). ZIKV também pode ser detectado na placenta e cabeça dos fetos (Figura 18C). Interessantemente, a partir da marcação com CFSE dos neutrófilos infectados *in vitro* foi possível o rastreamento destas células no sangue, baço e placentas destas células (Figura 18D). Vale ressaltar, que enquanto os neutrófilos CFSE⁺ compreendem de 1 a 1,5% dos neutrófilos totais no sangue e baço, na placenta essa frequência aumenta para 5%.

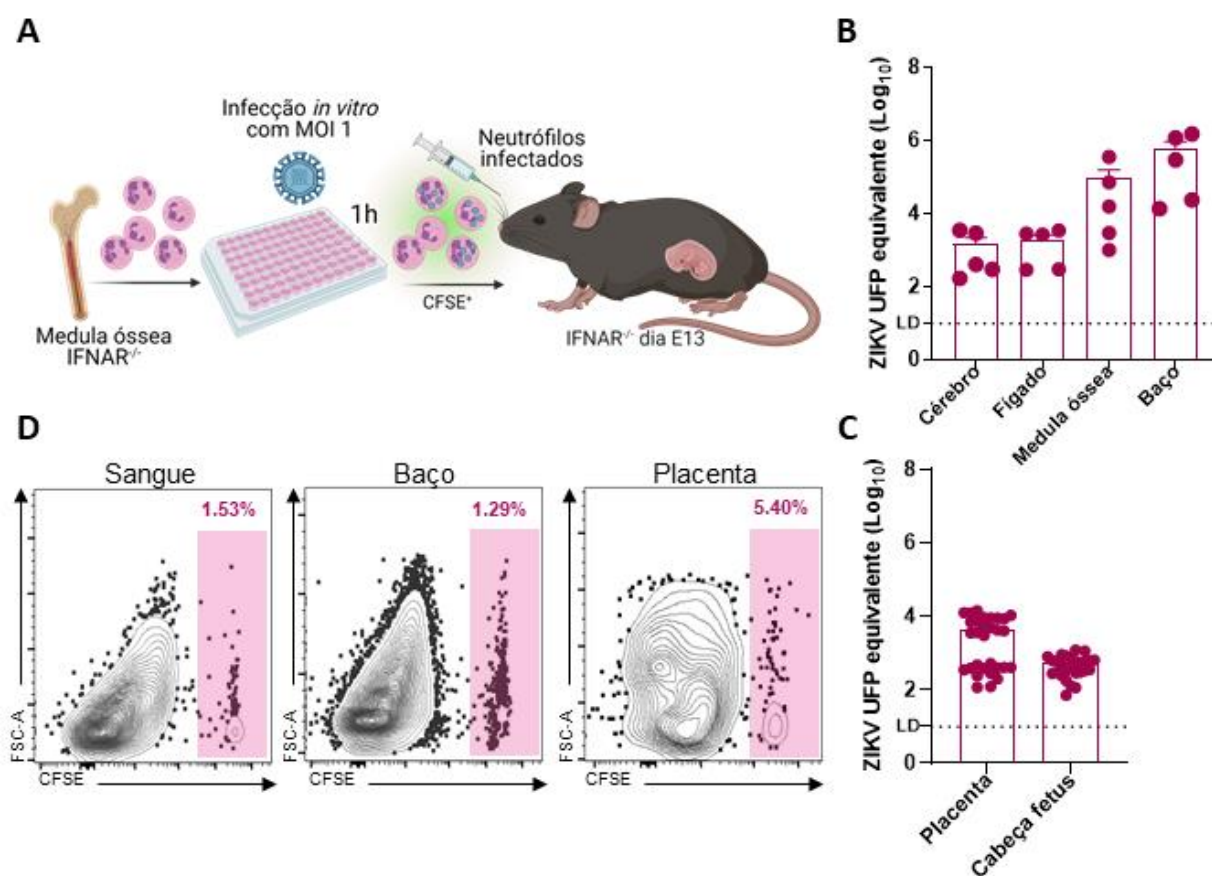


Figura 18: Transferência de neutrófilos infectados é capaz de causar infecção sistêmica. A) Desenho experimental. Neutrófilos da medula óssea de animais C57BL/6 IFNAR^{-/-} foram infectados *in vitro* com MOI 1 por 1 hora e transferidos para C57BL/6 IFNAR^{-/-} no dia 13 de gestação. Vinte e quatro horas após, **B)** o cérebro, fígado, medula óssea e baço das prenhes, e **C)** as placentas e cabeças dos fetos foram coletados e utilizados para quantificação de RNA viral por RT-qPCR. **D)** Neutrófilos infectados *in vitro* foram marcados com CFSE antes da transferência e, portanto, foi possível detectar estas células no sangue, baço e placenta por citometria de fluxo. Resultados de 2 experimentos independentes com 2 ou 3 animais prenhes.

A seguir, avaliamos se o aumento de neutrófilos na circulação sanguínea dos animais IFNAR^{-/-} prenhes acarretaria no aumento da carga viral nos tecidos fetais e na piora nos parâmetros relacionados à Síndrome Congênita do Zika vírus. Para isso, animais IFNAR^{-/-} prenhes no dia E13 foram tratados com rHu G-CSF e após dois dias foram infectados com ZIKV (Figura 19A). Filhotes de mães tratadas com rHu G-CSF e infectadas com ZIKV apresentaram restrição de crescimento uterino e diminuição da circunferência do crânio equivalentes aos filhotes de mães apenas infectadas com ZIKV (Figura 19B). Entretanto, embora não tenham apresentado piora nos parâmetros avaliados, o cérebro dos filhotes de mães tratadas com rHu G-CSF e infectadas com ZIKV apresentaram maior carga viral (Figura 19C).

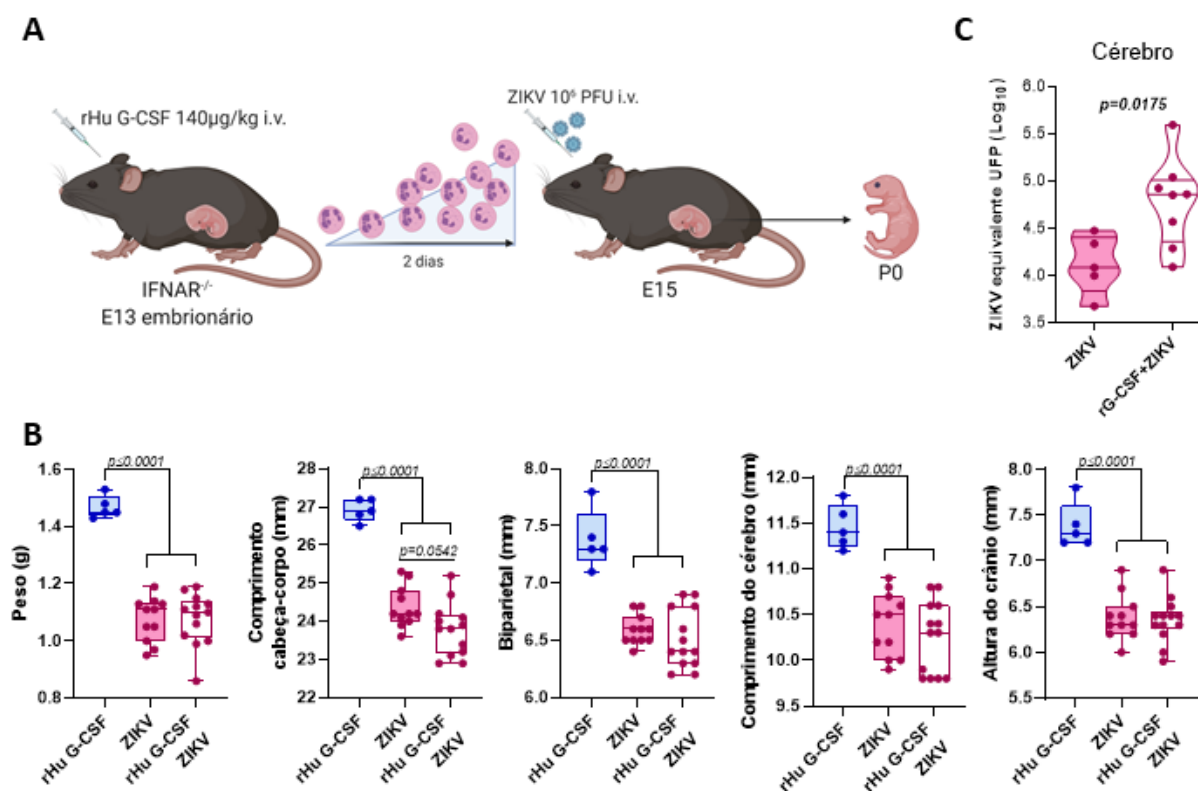


Figura 19: Aumento do número de neutrófilos nas primeiras horas de infecção resulta em maior carga viral na prole. A) Desenho experimental. Animais C57BL/6 IFNAR^{-/-} no dia 13 de gestação (E13) foram tratados com 140µg de rHu G-CSF via i.v. e 2 dias após foram infectados com 10⁶ UFP de ZIKV. No dia do nascimento, a prole foi medida para análises dos parâmetros morfológicos e (B) o cérebro foi utilizado para a quantificação de RNA viral por RT-qPCR. C) Análise do peso, comprimento do corpo, biparietal, comprimento e altura do crânio dos filhotes. Dados representativos de pelo menos 2 experimentos com 2 prenhes em cada grupo. One-way anova ou t-test foram usados nas análises estatística.

4.1.7. Neutr3filos de placentas infectadas expressam marcadores de ativa33o celular e MHC-I

Conforme mostrado anteriormente por Lum e colaboradores, 2019, neutr3filos compreendem mais de 80% das c3lulas CD45⁺ na placenta humana infectada com ZIKV²³⁹. A partir de dados de RNAseq dispon3veis de c3lulas CD45⁺ da placenta humana infectada com ZIKV no primeiro trimestre de gravidez e placenta saud3vel, avaliamos se a infec33o poderia alterar genes relacionados 3s fun33es dos neutr3filos. Descobrimos que genes relacionados 3 ativa33o e degranula33o de neutr3filos foram regulados negativamente na placenta infectada com ZIKV (Figura 20A). De fato, a an3lise da ontologia g3nica (GO) de genes regulados negativamente na placenta infectada com ZIKV mostrou enriquecimento das vias de resposta imune, como ativa33o e degranula33o de leuc3citos, granul3citos e neutr3filos, processamento e apresenta33o de ant3genos e sinaliza33o mediada por citocinas (Figura 20B). As vias dos processos de infec33o viral, como a express3o e a transcri33o de genes virais, tamb3m foram enriquecidas (Figura 20C). Em conjunto, essas an3lises mostraram que a infec33o pelo ZIKV promove regula33o negativa de genes relacionados 3 resposta imune e 3 fun33o dos neutr3filos na placenta.

Tendo em vista que neutr3filos podem auxiliar na dissemina33o de v3rus para a placenta, avaliamos a frequ3ncia e n3mero destas c3lulas na placenta de animais controles entre os dias E11 e E19 de gesta33o. Embora em maior frequ3ncia (Figura 21A) nos dias E18-19, o maior n3mero de neutr3filos (Ly6G⁺) na placenta foi detectado nos dias E16-17 (Figura 21B). Observamos tamb3m, a frequ3ncia e n3mero de c3lulas Ly6G⁻CD11b⁺, elevados nos dias E11-12 e E16-17, respectivamente.

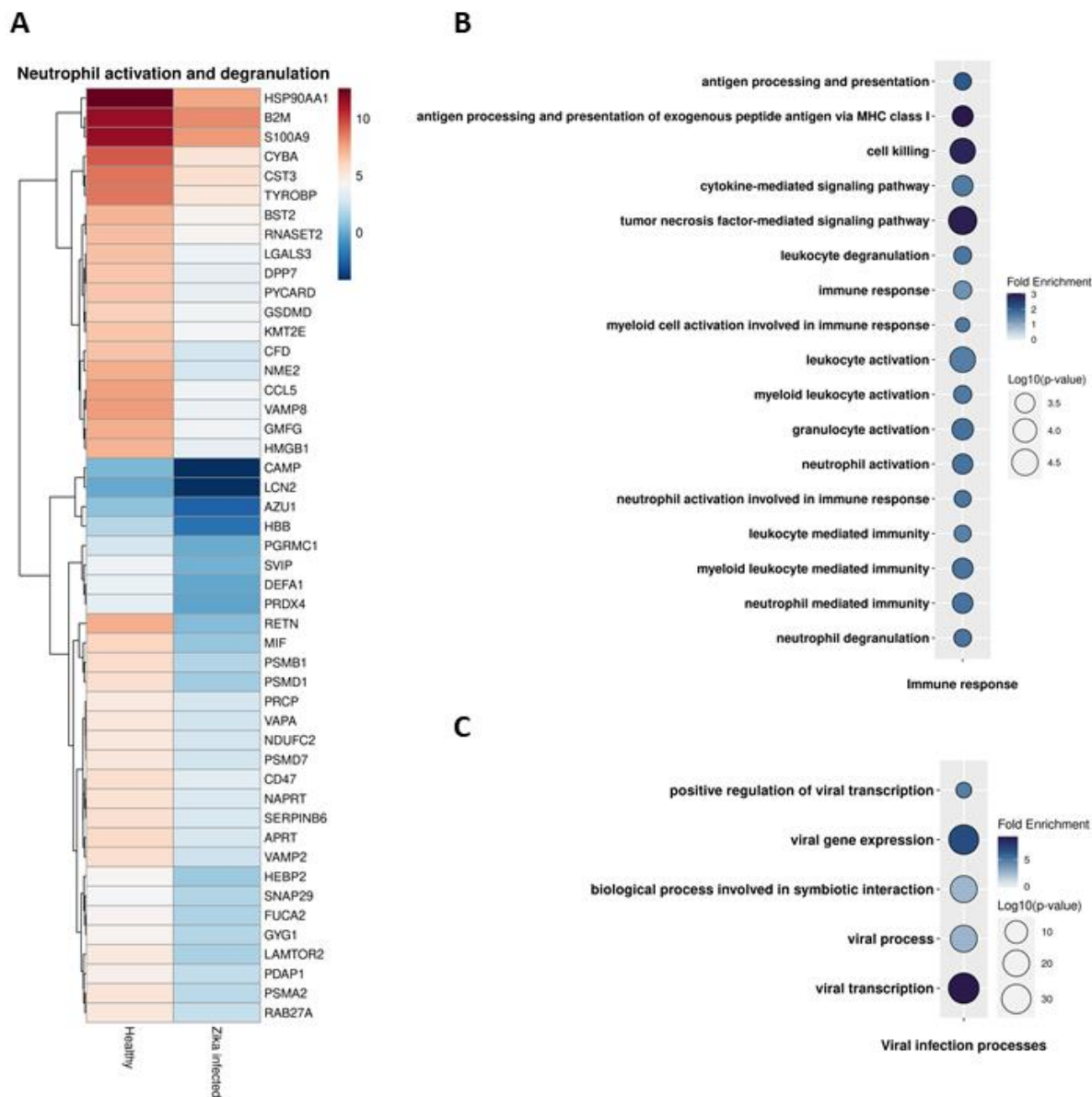


Figura 20: Análise de RNAseq de células CD45⁺ de placenta de indivíduos infectados com ZIKV no primeiro trimestre de gestação. Placenta pré-termo de indivíduos infectados no primeiro trimestre da gestação e indivíduos saudáveis foram divididas entre lado materno e feta. No lado materno, as células foram separadas entre CD45⁺ e CD45⁻ e seguidas para o sequenciamento de RNA. Estes dados foram publicados e depositados pelo grupo de Lum em 2019²³⁹. A partir dos dados disponíveis, buscamos genes referentes à ativação e degranulação de neutrófilos como apresentados em **A**, e a partir dos genes regulados negativamente avaliamos o enriquecimento de vias, dentre elas de relacionada a **B**) resposta imune e **C**) processos virais.

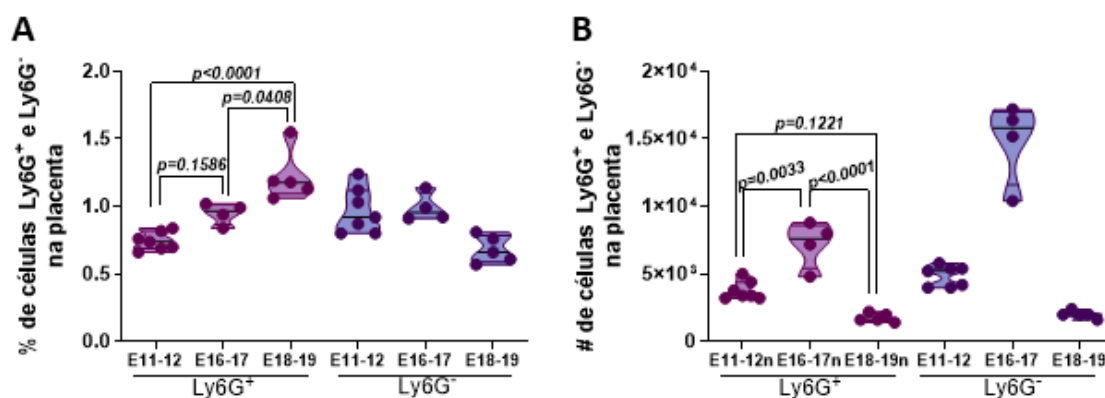


Figura 21: Quantidade de neutrófilos e células CD11b⁺Ly6G⁻ na placenta. Nos determinados dias de gestação, as placentas de animais C57BL/6 IFNAR^{-/-} foram coletadas e analisadas quanto a frequência e número de neutrófilos e células CD11b⁺Ly6G⁻. T-test foi utilizado nas análises estatística.

Uma vez que em nosso modelo observamos a presença de neutrófilos na placenta, nos questionamos qual seria o perfil destas células numa infecção por ZIKV. Para isso, animais IFNAR^{-/-} prenhes no dia E13 foram infectadas, e no dia E17 os animais foram eutanasiados e as placentas coletadas e os neutrófilos das placentas foram analisados (Figura 22A). Nas placentas avaliamos a frequência, número absoluto e fenótipo dos neutrófilos.

A infecção por ZIKV induziu 2 vezes o aumento da frequência de neutrófilos na placenta sem alterar o número total destas células (Figura 22B). Também observamos que estes neutrófilos apresentavam altíssimos níveis de expressão de MHC-I em comparação aos neutrófilos de placentas saudáveis (Figura 22C). Além disso, ZIKV induziu o aumento da expressão de outras moléculas de ativação celular, como MHC-II (Figura 22D), CD80 (Figura 22E) e CD86 (Figura 22F).

Devido à alta expressão de MHC-I, cogitamos que estes neutrófilos estariam infectados com ZIKV. Para tanto, estabelecemos um protocolo para o isolamento de neutrófilos, e também de células CD11b⁺Ly6G⁻, da placenta (Figura 23A). Após o isolamento, confirmamos nossa hipótese de que os neutrófilos das placentas estavam infectados com ZIKV, com carga viral equivalente à das células CD11b⁺Ly6G⁻ (Figura 23B).

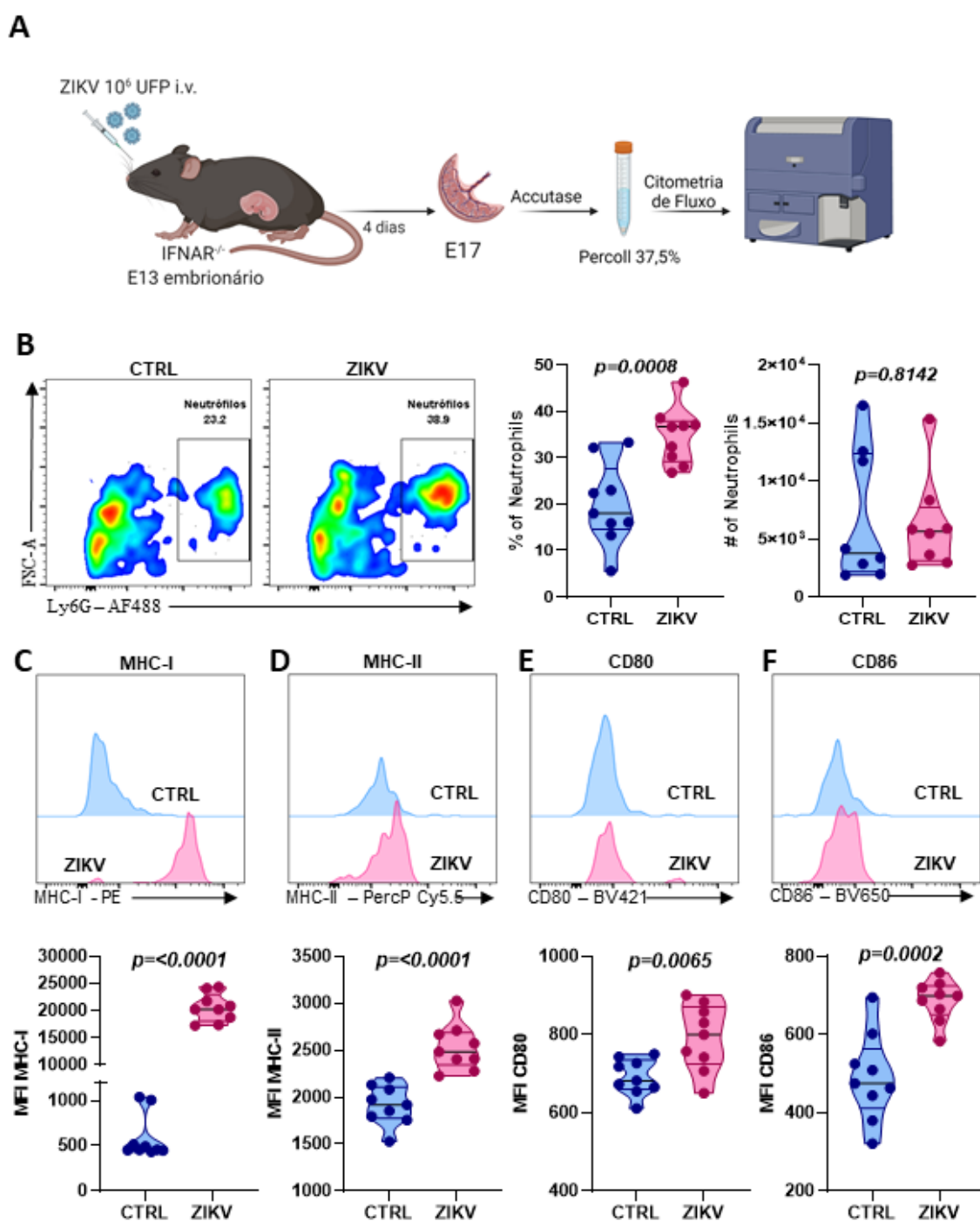


Figura 22: Neutrófilos de placenta de animais infectados por ZIKV expressão marcadores de ativação celular. A) Desenho experimental. Animais C57BL/6 IFNAR^{-/-} no dia 13 de gestação (E13) foram infectados com 10^6 UFP de ZIKV via i.v. Quatro dias após, no dia E17, as placentas dos animais foram coletadas e processadas, e a suspensão celular foi utilizada para análise da população de neutrófilos e marcadores celulares. B) Frequência e número de neutrófilos presentes em placentas de animais controles e infectados. À esquerda, dot plot representativo da frequência de neutrófilos, enquanto que a direita, gráfico mostrando a frequência e número de neutrófilos. Expressão de C) MHC-I, D) MHC-II, E) CD80 e F) CD86 em neutrófilos. Painel acima são os dot plots representativos. Dados representativos de 3 experimentos com 3 placentas em cada grupo. T-test foi utilizado nas análises estatísticas.

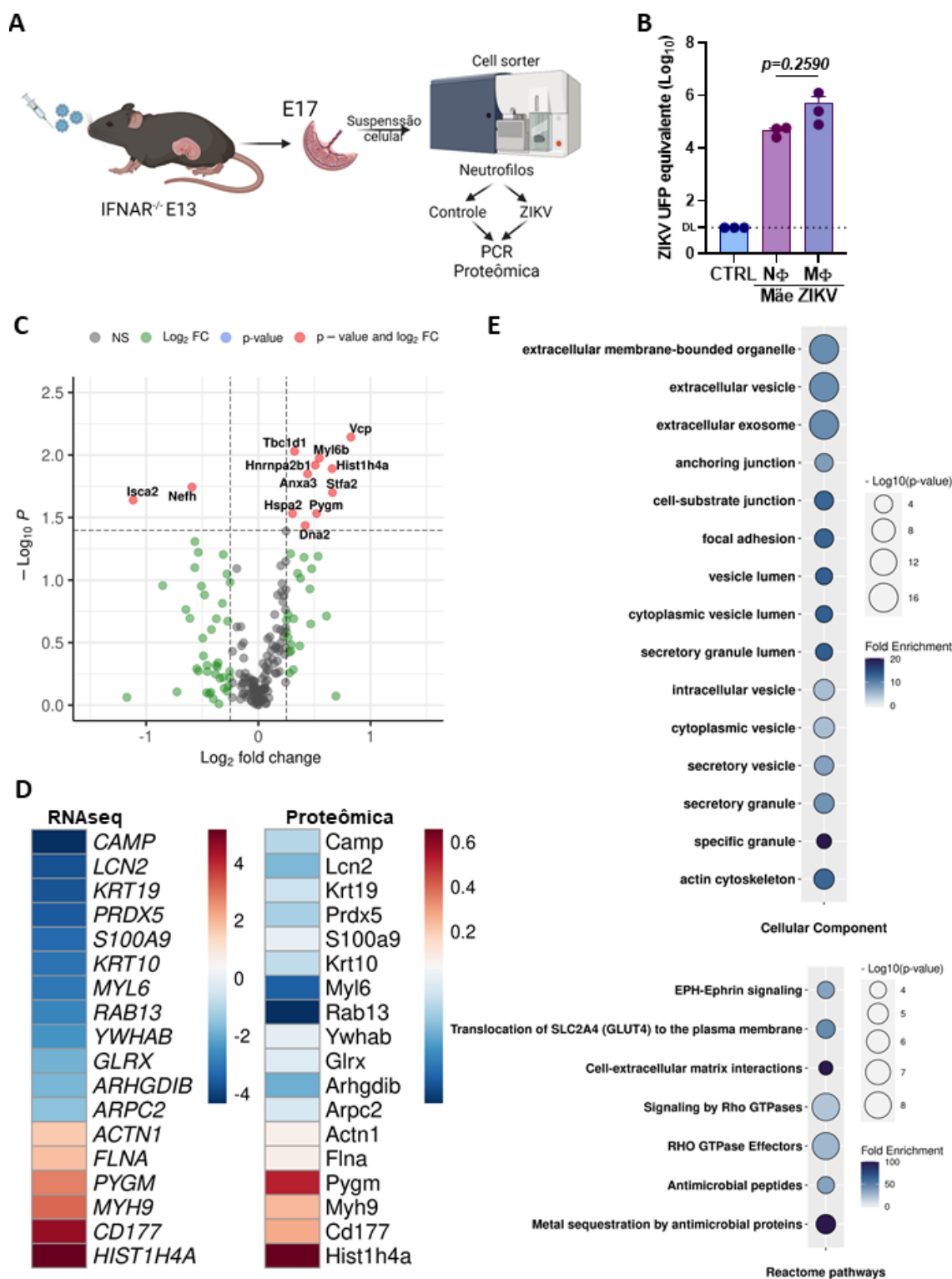


Figura 23: Perfil de proteínas dos neutrófilos de placenta infectados com ZIKV. A) Desenho experimental. Camundongos IFNAR^{-/-} prenhes no dia E13 foram infectadas e no dia E17 as placentas foram coletadas e enzimaticamente e mecanicamente dissociadas e submetidas a separação de neutrófilos por *cell sorting*. B) Neutrófilos e macrófagos isolados da placenta foram submetidos a RT-qPCR para quantificação de RNA viral. C) Neurófilos da placenta de animais controles e infectados com ZIKV foram submetidos à análise de proteômica. Volcano plot com a expressão das 12 proteínas que foram expressas diferentemente dentre as 192 proteínas detectadas

na proteômica. **D)** Genes e proteínas concordantes expressos em no RNAseq de células CD45⁺²³⁹ e na proteômica. **E)** Ontologia gênica das vias enriquecidas dos genes e proteínas expressos em ambas análises.

Considerando a infecção dos neutrófilos placentários e alta expressão de marcadores de ativação, estas células foram submetidas à caracterização do perfil de proteínas totais por proteômica. Esta análise resultou na detecção de apenas 192 proteínas, dentre elas apenas 12 foram diferentemente expressas entre neutrófilos controles e ZIKV (Figura 23C), enquanto que as outras 180 tiveram sua expressão inalterada. Devemos atentar que, a cobertura da proteômica foi baixa devido ao baixo número de neutrófilos e, conseqüentemente, baixa concentração de proteínas para a análise. Dentre estas proteínas diferentemente expressas, 10 foram positivamente reguladas na infecção por ZIKV (Pygm, Mtl6b, Anxa3, Stfa2, Tbc1d1, Vcp, Hnrnpa2ba, Dna2, Hspa2 e Hist1h4a), enquanto que apenas 2 proteínas foram reguladas negativamente (Nefh e Isca2).

Próximo passo, comparamos nossos dados de proteômica com os dados de RNAseq²³⁹ e detectamos 18 proteínas e genes concordantes. Dentre estes, 12 genes e proteínas regulados negativamente, enquanto que 6, regulados positivamente (figura 23D). Vale ressaltar, que nesta análise avaliamos todas as proteínas detectadas na proteômica independentemente da diferença estatística entre controle e infectado. Nesta etapa, nossa intenção era avaliar o que tinha sido detectado e concordante em ambos os data sets. Portanto, quando falamos de regulação positiva ou negativa nesta análise comparativa de RNAseq e proteômica, estamos falando de proteínas que consideramos ou não como diferentemente expressas na análise anterior.

Dentre estes genes e proteínas concordantes, vale ressaltar aqueles envolvidos diretamente com as funções de neutrófilos, como Camp, Lcn2 e S100A9 que estão regulados negativamente, e interessantemente a proteína CD177, envolvida com bloqueio de migração de neutrófilos. Além disso, também foram detectadas proteínas envolvidas com metabolismo, rearranjo de citoesqueleto e exocitose, vesículas extracelulares e migração celular, como pode ser visto pelo enriquecimento das vias em que estas proteínas fazem parte (Figura 23E).

4.1.8. Indivíduos infectados com ZIKV produzem altos níveis de IL-8

IL-8, ou CXCL8, tem papel chave no recrutamento de neutrófilos²⁴⁰. Aqui cogitamos a possibilidade do envolvimento da IL-8, dentre outras citocinas, durante a infecção por ZIKV. Quantificamos IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-10, TNF e IL12p70 no soro de indivíduos infectados com ZIKV e Chikungunya vírus (CHIKV), outra arbovirose.

A produção de IL-8 foi elevada tanto em pacientes infectados com ZIKV quanto os infectados com CHIKV. Entretanto, os níveis detectados nos pacientes com ZIKV foi mais elevado em comparação aos produzidos por indivíduos infectados com CHIKV (Figura 24A). Por outro lado, a citocina IL-6, aumentada em ambas infecções, está mais elevada nos pacientes infectados com CHIKV do que nos pacientes com ZIKV (Figura 24B). IL-10 também foi detectada em altos níveis no soro dos pacientes infectados, e nenhuma diferença entre as infecções foi detectada (Figura 24C). Níveis de IL-1 β e TNF- α não foram diferentes entre os indivíduos infectados e não infectados (Figura 24D e E), embora pareça existir uma tendência ao aumento de IL-1 β nos indivíduos infectados com ZIKV (Figura 24D).

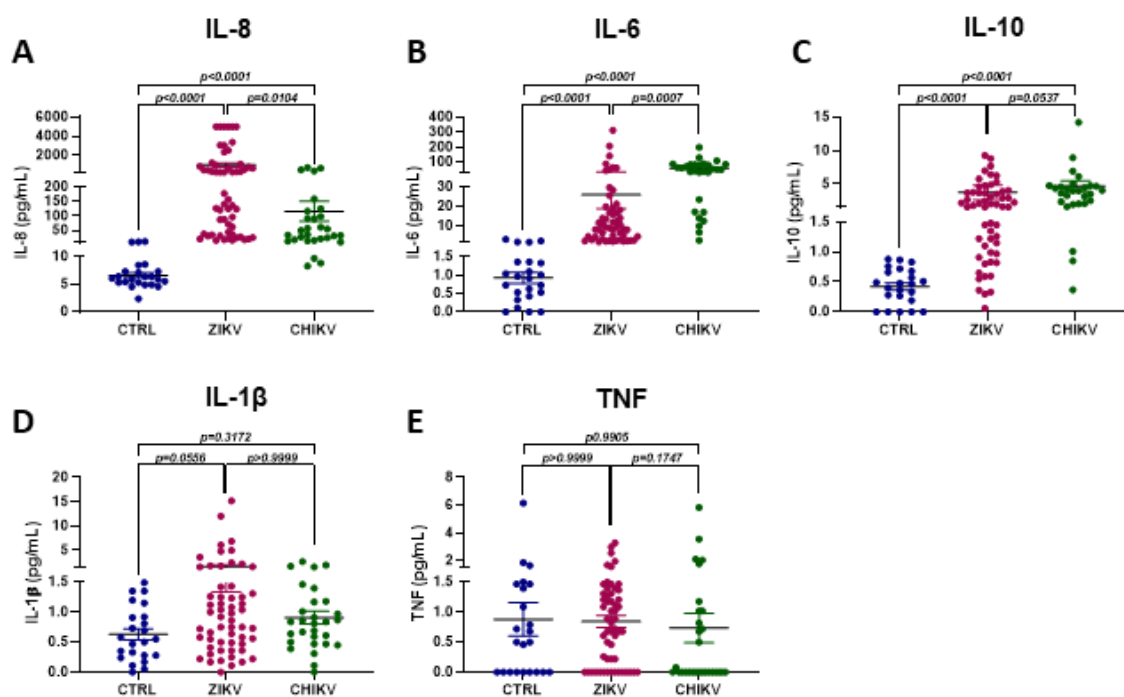


Figura 24: Perfil de citocinas produzidas durante infecção por arbovirose. O soro de indivíduos saudáveis e infectados por ZIKV ou CHIKV foi coletado para quantificação de citocinas plasmáticas utilizando o kit CBA human Inflammatory cytokine (BD Bioscience). Quantificação de **A)** IL-8, **B)** IL-6, **C)** IL-10, **D)** IL-1 β e **E)** TNF. Dados contendo de 23 a 58 amostras. One-way anova foi utilizado para as análises estatísticas.

4.1.9. Células T CD8 proliferam menos na presença de neutrófilos infectados por ZIKV

Em infecção por IAV, neutrófilos apresentam antígeno via MHC-I e induzem proliferação de células T CD8⁺²⁴¹. Aqui, nos questionamos se os neutrófilos infectados *in vitro* seriam capazes de induzir a proliferação de células T CD8⁺ *in vitro*, embora saibamos que estes neutrófilos apresentem baixa expressão de MHC-I (Figura 9C). Para isso, células T CD8⁺ de animais C57BL/6 foram enriquecidas com colunas para seleção negativa de CD8 e cultivadas em contato com neutrófilos, também de animais C57BL/6, na presença ou não de ZIKV. Para este experimento, foi utilizado a proporção de 4 neutrófilos para 1 célula T CD8⁺ (4 NΦ : 1 CD8), e neutrófilos infectados com MOI 1. Estas células foram incubadas por 3 dias na presença ou não de anti-CD3 e anti-CD28 e a diluição do corante Cell trace violet (CTV) foi considerado como indicativos de proliferação celular. Células únicas foram analisadas dentro do gate de tamanho e granulosidade referentes a células CD8. Células positivas para CD8 foram então analisadas quanto a diluição do corante CTV (Figura 25A).

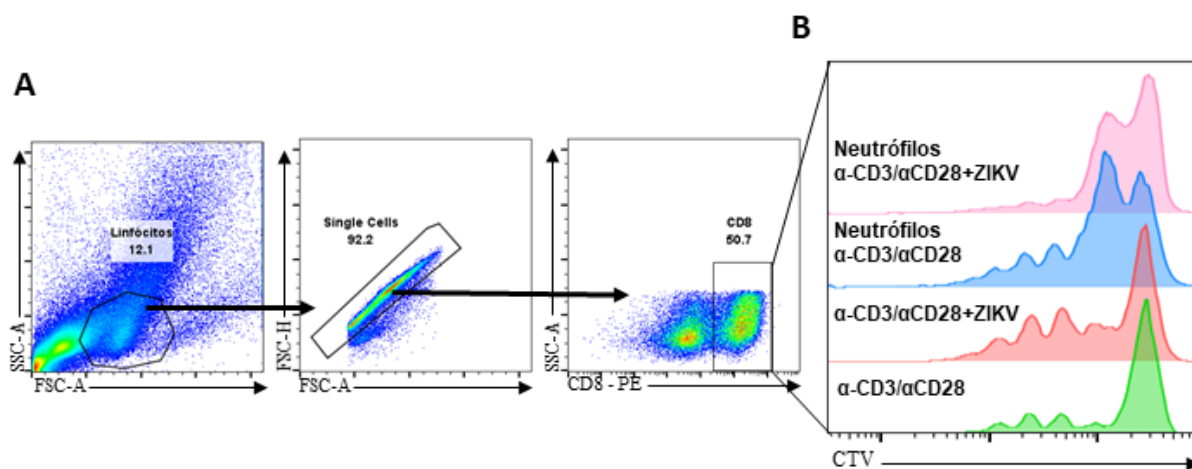


Figura 25: Proliferação de células T CD8⁺ na presença de neutrófilos infectados com ZIKV. Células T CD8⁺ esplênicas de animais C57BL/6 foram isoladas e incubadas com neutrófilos isolados de medula óssea na presença de ZIKV por 72 horas. **A)** Estratégia de gate para a análise da proliferação celular. **B)** Histograma representativo da proliferação celular baseada na diluição de *cell trace violet* (CTV). Células T CD8⁺ foram incubadas na presença de anti-CD3 (α -CD3 - 5 μ g/mL) and anti-CD28 (α -CD28 - 5 μ g/mL). Neutrófilos foram adicionados na proporção de 4:1 em relação ao número de células T CD8⁺, enquanto que MOI 1 de ZIKV foi adicionado à cultura. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

Observamos que células T CD8⁺ na presença de ZIKV (curva em vermelho) proliferam mais do que na ausência do vírus (curva em verde) (Figura 25B). Como descritos em outros trabalhos, células T CD8⁺ proliferam mais na presença de neutrófilos (curva azul em comparação a curva verde). Entretanto, neutrófilos infectados por ZIKV reduzem a capacidade proliferativa das T CD8⁺ (curva rosa em comparação a todas outras curvas).

Aqui, mostramos que neutrófilos infectados por ZIKV possuem menor capacidade de indução da proliferação de células T CD8⁺ *in vitro*, o que vai ao encontro dos nossos dados mostrando que neutrófilos infectados *in vitro* com ZIKV não apresentam nenhum sinal de ativação celular, e tampouco expressão de MHC-I (Figura 9).

4.2. Papel dos linfócitos T CD8 reguladores na infecção por Zika vírus

4.2.1. Células T CD8 na infecção por ZIKV

Linfócitos T CD8 são células de grande importância no controle de infecções virais. São capazes de reconhecer células infectadas e, por diversos mecanismos, induzir morte celular das células-alvo¹⁵⁹⁻¹⁶⁴. Aqui avaliamos a relevância das células T CD8⁺ na infecção por ZIKV. Observamos que a infecção por ZIKV em animais deficientes de células T CD8⁺ resulta em perda de peso corporal a partir do 13º dia de infecção (Figura 26A) que pode estar relacionado à redução no consumo de ração (Figura 26B) em comparação aos animais selvagens C57BL/6. Porém, nenhum dos animais avaliados neste estudo apresentaram outros sinais clínicos da infecção como os descritos em animais susceptíveis⁴⁷.

Avaliamos a carga viral em alguns tecidos e também no soro de ambas linhagens por até 15 dias após a infecção. No soro, animais deficientes de células T CD8⁺ apresentaram maior viremia no pico da infecção (dia 1 após infecção – Figura 26C), enquanto que nenhuma diferença foi detectada nos tempos seguintes em comparação aos animais C57BL/6. No cérebro, não observamos diferença entre os grupos até o 7º dia após infecção e, a partir de então, animais C57BL/6 apresentam drástica redução na carga viral enquanto que os CD8^{-/-} aumento progressivo (Figura 26D).

De encontro aos resultados obtidos no soro, animais CD8^{-/-} possuem menor carga viral no baço no primeiro dia após a infecção, enquanto que nenhuma diferença foi detectada nos dias seguintes (Figura 26E). Vale ressaltar que quando se avalia a curva virêmica e de carga viral no baço, pode-se observar um perfil muito similar entre ambas, porém oscilatório entre os grupos B6 e CD8^{-/-}. Após o pico da infecção, quando se observa os animais B6, com maior carga viral no baço e CD8^{-/-}, com maior carga viral no soro, no dia 3, ambos os grupos (B6 e CD8^{-/-}) apresentam o mesmo número de cópias virais. Interessantemente, a partir do dia 5 pós infecção pode-se observar a inversão das duas curvas, em que os animais B6 passam a apresentar menor carga viral no baço, enquanto que, animais CD8^{-/-}, passam a ter tendência a menor viremia.

E por último, deficiência em células T CD8⁺ não altera a replicação viral nos testículos dos animais infectados (Figura 26F). Até aqui, mostramos que a carga viral em animais deficientes de células T CD8⁺ é variável de acordo com o tecido analisado.

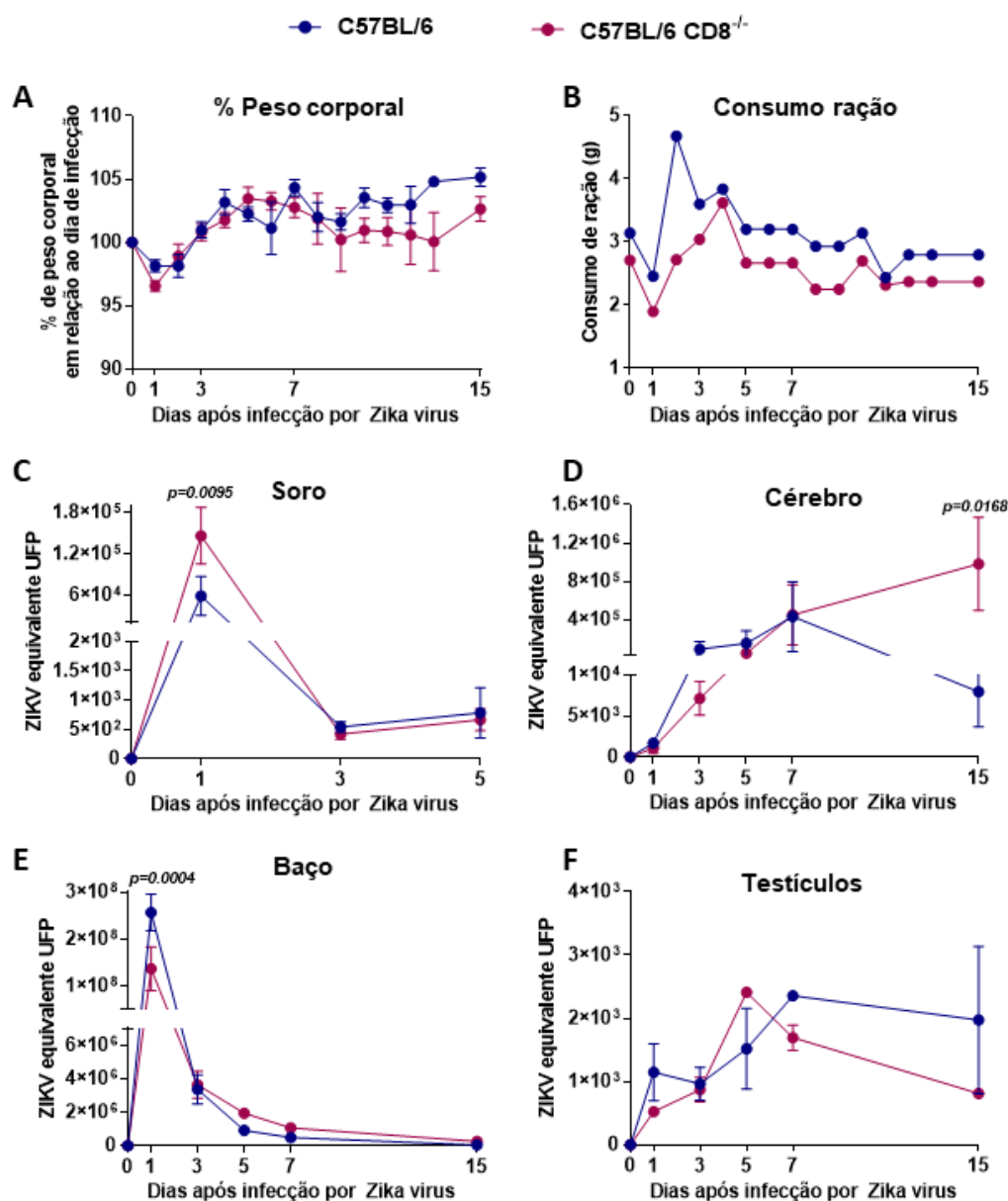


Figura 26: Perfil da carga viral de animais C57BL/6 e animais deficientes de células T CD8⁺ infectados com ZIKV. Animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8^{-/-} foram infectados com 10^6 PFU de ZIKV via i.v. e acompanhados diariamente por 15 dias **A)** quanto ao peso corporal e **B)** consumo de ração. A carga viral foi avaliada por RT-qPCR no **C)** soro, **D)** cérebro, **E)** baço e **F)** testículos nos dias 1, 3, 5, 7 e 15 após infecção. Dados representativos de pelo menos 3 experimentos com 3 animais em cada grupo. One-way anova foram usados nas análises estatística.

4.2.2. A ausência de células T CD8⁺ altera o perfil de expressão gênica durante a infecção por ZIKV

Na busca por entender o porquê da variação do perfil de carga viral em tecidos como baço e sangue, realizamos PCR *array*, para genes relacionados a imunidade inata e

adaptativa, das amostras de baço 1 dia após a infecção, comparando animais infectados das duas linhagens e detectamos a alteração de vários genes. Para a análise, consideramos diferentemente expressos apenas genes com *fold change* igual ou maior a 2 (-2 e +2). Dentre os 84 genes analisados no PCR *array*, apenas 10 genes foram regulados positivamente, enquanto que 15, regulados negativamente (Tabela 2 e Figura 27A).

Os genes que apresentaram maiores alterações determinado por *fold change* igual ou maior que 2,5 (-2,5 e +2,5) foram destacados, dentre eles encontra-se *FasL* (+6,95), *Mx1* (+4,01), *CD40lg* (+3,73), *IL-13* (+2,93), *Rag1* (+2,76), *Tlr-3* (+2,88) e *Irf3* (+2,19) como os positivamente regulados. Enquanto que, *Tlr5* (-4,46), *Crp* (-4,31), *Mbl2* (-3,16), *H2-Q10* (-2,82), *Mpo* (-2,57), *Ifna2* (-2,44), *Il-1a* (-2,23), *Il-1b* (-2,21), *Tbx21* (-2,22), *Tyk2* (-2,19) e *Tnf* (-2,14) regulados negativamente (Figura 27A – direita).

Tabela 2: Genes positivamente e negativamente regulados durante a infecção por ZIKV em animais CD8^{-/-}. Animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8^{-/-} foram infectados via intravenosa com 10⁶ PFU em 100µL de PBS, animais controles receberam o mesmo volume de PBS pela mesma via de inoculação. Um dia após a infecção, o baço dos animais foi coletado e seguido o protocolo de PCR *array* - *Innate and Adaptive Immune response RT²Profiler PCR array* - Qiagen®. Distribuição de 25 dentre os 84 genes investigados no baço como “positivamente-regulados”, à esquerda, ou “negativamente-regulados”, à direita, em comparação entre os animais CD8^{-/-} e B6 infectados com ZIKV.

Genes “positivamente-regulados”		Genes “negativamente-regulados”	
Grupo CD8 ^{-/-} vs. Grupo B6		Grupo CD8 ^{-/-} vs. Grupo B6	
Gene	Fold Regulation	Gene	Fold Regulation
<i>Ccr5</i>	2.01	<i>Cd80</i>	-2.17
<i>Cd40lg</i>	3.73	<i>Cd8a</i>	-2.24
<i>Fasl</i>	6.95	<i>Crp</i>	-4.31
<i>Il13</i>	2.93	<i>H2-Q10</i>	-2.82
<i>Irf3</i>	2.19	<i>Ifna2</i>	-2.44
<i>Mx1</i>	4.01	<i>Il17a</i>	-2.01
<i>Nfkb1</i>	2.4	<i>Il1a</i>	-2.23
<i>Nfkbia</i>	2.09	<i>Il1b</i>	-2.21
<i>Rag1</i>	2.76	<i>Mbl2</i>	-3.16
<i>Tlr3</i>	2.88	<i>Mpo</i>	-2.57
		<i>Nod2</i>	-2.33
		<i>Tbx21</i>	-2.22
		<i>Tlr5</i>	-4.46
		<i>Tnf</i>	-2.14
		<i>Tyk2</i>	-2.19

Levando em consideração a baixa expressão de *Ifna2* obtida no PCR *array* no primeiro dia após a infecção, avaliamos por RT-qPCR a expressão de *Ifna* e *Ifnb* durante 7 dias de infecção. A infecção por ZIKV induz o aumento de ambos os interferons em animais C57BL/6. Em animais $CD8^{-/-}$ *Ifna* e, também *Ifnb*, são induzidos em menor amplitude comparado aos animais C57BL/6 no primeiro dia após a infecção. Entre os dias 3 e 7 de infecção, tanto animais selvagens quanto os deficientes de células T $CD8^{+}$ expressam níveis equivalentes dos interferons. O que nos levar a crer que neste modelo estes genes não teriam influência sobre o controle da replicação viral. Uma vez que a menor expressão destes genes estaria associada com maior carga viral neste órgão.

4.2.3. Perfil de citocinas produzidas durante a infecção por ZIKV

A produção de citocinas como IFN- α e IFN- β , IFN- λ , IFN- γ e TNF durante a infecção por flavivírus, são de grande importância no controle da replicação viral e eliminação de células infectadas. Aqui, traçamos o perfil de citocinas produzidas no baço e sangue afim de se compreender a razão pela qual a deficiência de células T $CD8^{+}$ resulta em menor carga viral no baço primeiro dia após a infecção por ZIKV.

Observamos que a infecção por ZIKV induz o aumento da produção de IL-6, TNF- α e IFN- γ no primeiro dia após a infecção (Figura 28B, C e F respectivamente), nenhuma diferença entre animais C57BL/6 e $CD8^{-/-}$ foi detectada. Interessantemente, IL-4 foi reduzida em ambos os grupos infectados no terceiro dia após a infecção (Figura 28A), enquanto que, IL-10 e IL-17A não apresentaram grandes diferenças durante a infecção (Figura 28D e E).

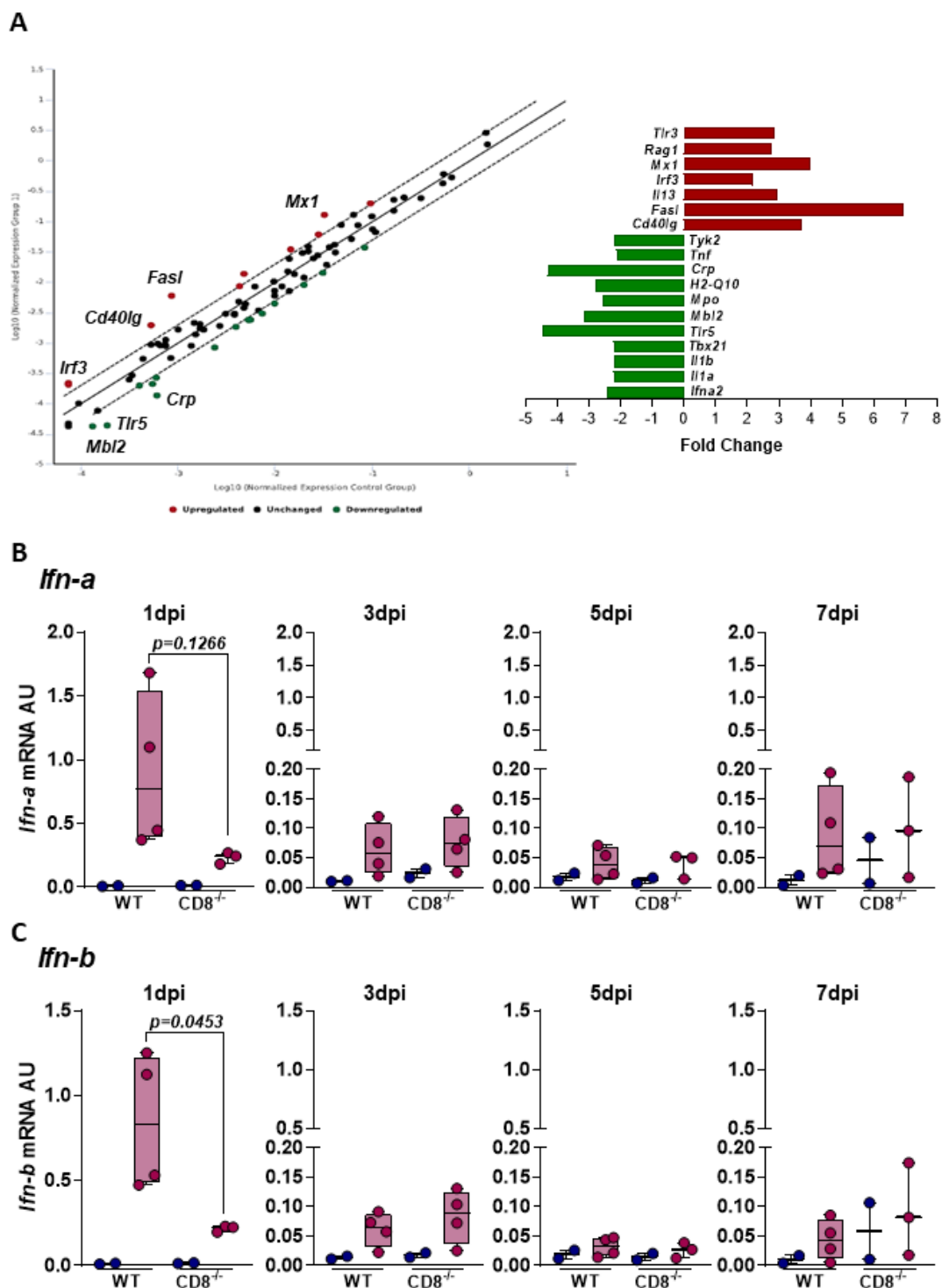


Figura 27: Perfil transcricional do baço de animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8^{-/-} infectados com ZIKV. A) Animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8^{-/-} foram infectados com 10⁶ PFU de ZIKV via i.v. e 24 horas após o baço foi coletado e o RNA total foi extraído e submetido a análise da expressão gênica utilizando o PCR array para *Mouse Innate and Adaptive Immune Response*. Genes diferentemente expressos foram destacados em vermelho, positivamente regulados, ou verde, negativamente regulados. A expressão do gene de B) *Ifn-α* e C) *Ifn-β* foi avaliada por RT-qPCR durante 7 dias após a infecção. Resultados em unidades arbitrárias (AU) da expressão relativa de *β-actina*. Dados representativos de pelo menos 3 experimentos com 3 animais em cada grupo. T-test foi utilizado para a análise estatística.

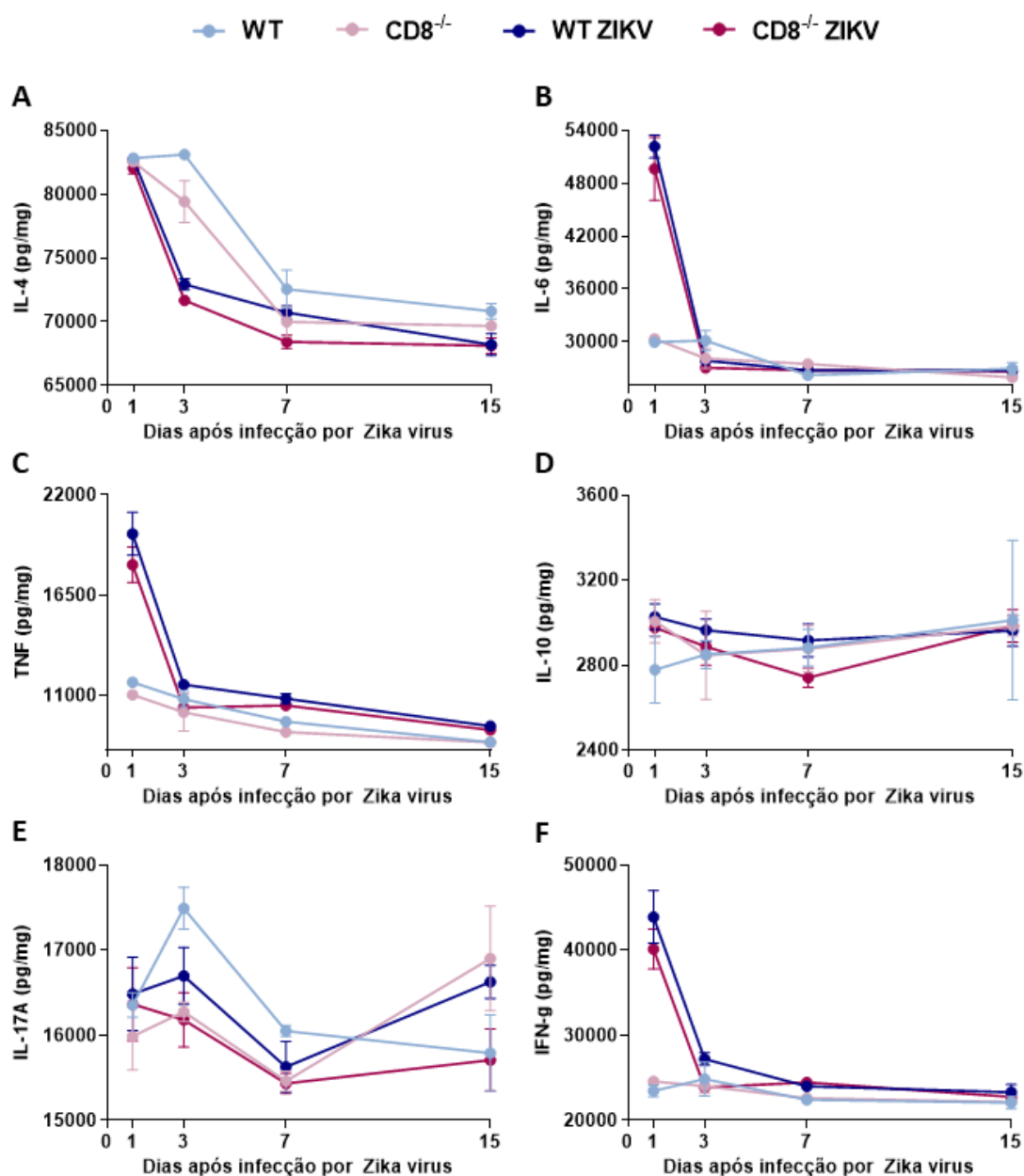


Figura 28: Perfil de citocinas no baço de animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8^{-/-} infectados com ZIKV. Animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8^{-/-} foram infectados com 10⁶ PFU de ZIKV via i.v. e o baço foi coletado nos dias 1, 3, 7 e 15 após a infecção para quantificação de citocinas do padrão Th1, Th2 e Th17 por *Cytometry Beads Array* (CBA). Quantificação de **A)** IL-4, **B)** IL-6, **C)** TNF, **D)** IL-10, **E)** IL-17a e **F)** IFN- γ . Dados representativos de pelo menos 3 experimentos com 3 animais em cada grupo. T-test foi utilizado para a análise estatística.

Contudo, quando avaliamos as citocinas presentes no soro um dia após a infecção, observamos que animais deficientes de células T CD8⁺ apresentavam menor quantidade de IFN- γ e, também, IL-10 quando infectados com ZIKV (Figura 29F e G), enquanto que nenhuma outra citocina quantificada apresentou diferença entre os grupos (Figura 29A –

E). Vale ressaltar que, embora com tendência, não existe diferença em IL-2 entre animais ou infecção (Figura 28E). Aqui, pela primeira vez, mostramos que animais infectados por ZIKV na ausência de células T CD8⁺ possuem menores níveis de IL-10 no soro. Além disso, vale lembrar, como mostrado na figura 24C, que também detectamos o aumento de IL-10 no soro de indivíduos infectados com ZIKV, mostrando que a indução desta citocina não está condicionada apenas ao nosso modelo de infecção experimental.

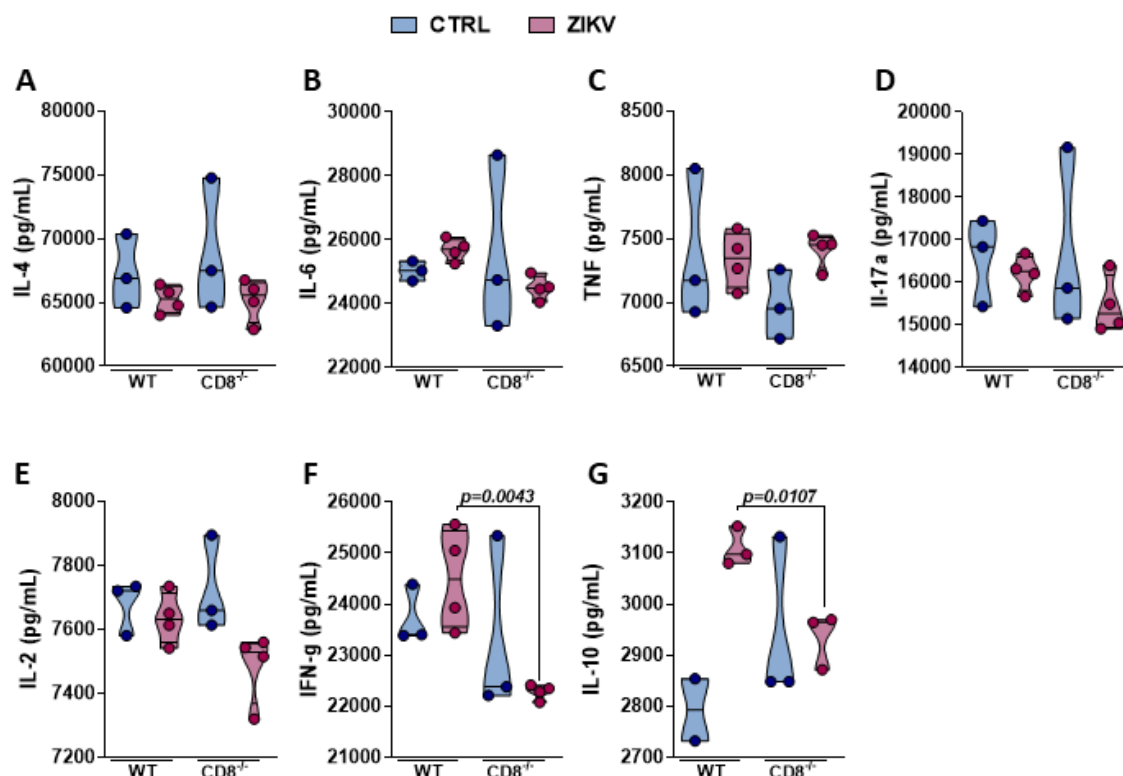


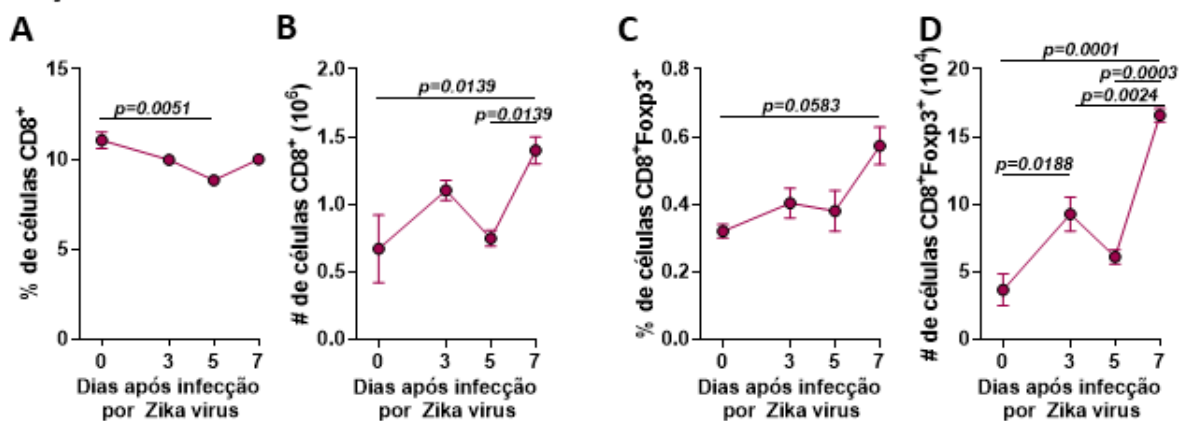
Figura 29: Citocinas no soro de animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8^{-/-} após a infecção com ZIKV. Animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8^{-/-} foram infectados com 10⁶ PFU de ZIKV via i.v. e 24 horas após o soro foi coletado e submetido a quantificação de citocinas do padrão Th1, Th2 e Th17 por *Cytometry Beads Array* (CBA). Quantificação de A) IL-4, B) IL-6, C) TNF, D) IL-17a, E) IL-2, F) IFN- γ e G) IL-10. Dados representativos de pelo menos 3 experimentos com 3 animais em cada grupo. T-test foi utilizado para a análise estatística.

4.2.4. Cinética de células T CD8⁺ na infecção por ZIKV

Células T CD8⁺reg são induzidas durante a infecção pelo vírus da imunodeficiência simia (SIV)²⁰⁸ e HHV-6²¹⁰ e estão relacionadas à supressão da resposta imune. A fim de avaliar as células T CD8⁺ convencionais e também às CD8reg na infecção por ZIKV, animais C57BL/6 *Foxp3*GFP foram infectados com 10² UFP via intravenosa. Assim, pudemos observar que a frequência das células T CD8 não altera

drasticamente durante os 7 primeiros dias após a infecção com ZIKV (Figura 30A), enquanto que o número total destas células varia, tendo o maior pico de expansão no dia 7 (Figura 30B).

Infecção 10^2 UFP de Zika vírus



Infecção 10^6 UFP de Zika vírus

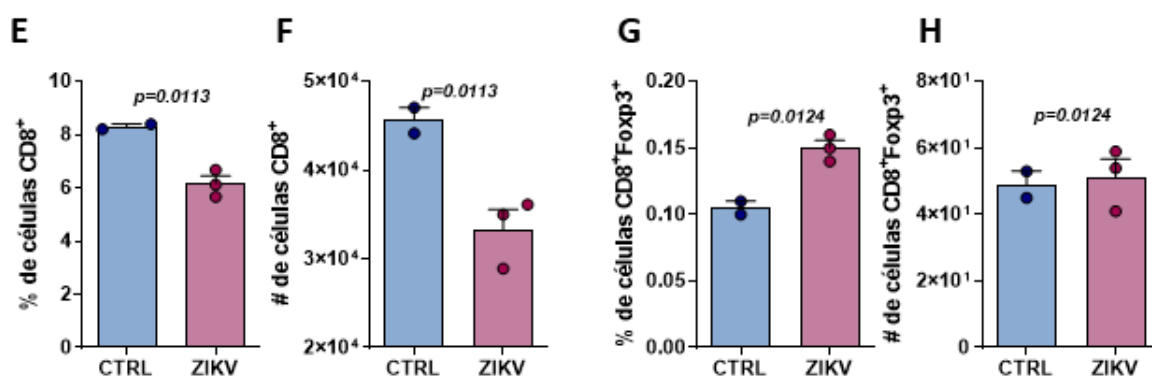


Figura 30: Cinética das populações de T CD8⁺ e T CD8⁺Foxp3⁺ no baço de animais C57BL/6 infectados com ZIKV. A-D) O baço de animais C57BL/6 Foxp3GFP controles ou infectados com 10^2 PFU de ZIKV foi coletado em diferentes tempos após a infecção e submetidos a marcação e análise de populações celulares por citometria de fluxo. Frequência e número absoluto de células A,B) T CD8⁺ e C,D) células T CD8⁺Foxp3⁺. E-H) Vinte e quatro horas após infecção com 10^6 PFU o baço de animais C57BL/6 Foxp3GFP controles ou infectados foi coletado e submetidos a marcação e análise de populações celulares por citometria de fluxo. E,F) T CD8⁺ e G,H) células T CD8⁺Foxp3⁺. Dados representativos de pelo menos 3 experimentos com 3 animais em cada grupo. T-test foi utilizado para a análise estatística.

A avaliação da expressão de Foxp3 dentro da população de células T CD8⁺ mostrou que até o dia 7 após a infecção ocorre o aumento da frequência e número da população de células CD8⁺Foxp3⁺ (Figura 30C e D). Avaliamos também se estas células são induzidas nas primeiras 24 horas após infecção. Para isso, infectamos animais

C57BL/6 *Foxp3*GFP com 10^6 UFP via intravenosa e 24 horas após analisamos as células T CD8⁺ do baço destes animais. Após 24 horas de infecção, existe uma contração número de células T CD8⁺ totais que se reflete na frequência desta população celular (Figura 30E e F). Além disso, embora exista esta redução de células T CD8⁺ totais, observamos que as células CD8⁺Foxp3⁺ estão aumentadas em frequência em relação ao grupo controle (Figura 30G), enquanto que nenhuma diferença em número foi detectada (Figura 30H). Foi possível observar o aumento na frequência e número das células T CD8⁺Foxp3⁺ foi mantido por até 30 dias após a infecção com ZIKV (dados não apresentados).

Sabe-se que algumas citocinas estão relacionadas com a diferenciação e manutenção de células T CD4⁺Foxp3⁺ reguladoras (Treg). A IL-33, uma alarmina, parece participar nestes eventos, como revisado por Michael Peine e colaboradores em 2016²⁴². Entretanto, nada se sabe sobre sua função da IL-33 na diferenciação de células T CD8⁺ reguladoras. Aqui, avaliamos a expressão gênica desta citocina durante a infecção por ZIKV em ambas linhagens de animais, C57BL/6 e CD8^{-/-}. Observamos que a IL-33 é altamente expressa até o terceiro dia após a infecção, independente da linhagem do camundongo (Figura 31A e B), o que poderia ser um indicativo para a indução das células T CD8⁺Foxp3⁺. Com o passar do tempo, a expressão deste gene retoma aos níveis equivalentes aos dos grupos controles sem infecção (Figura 31C e D).

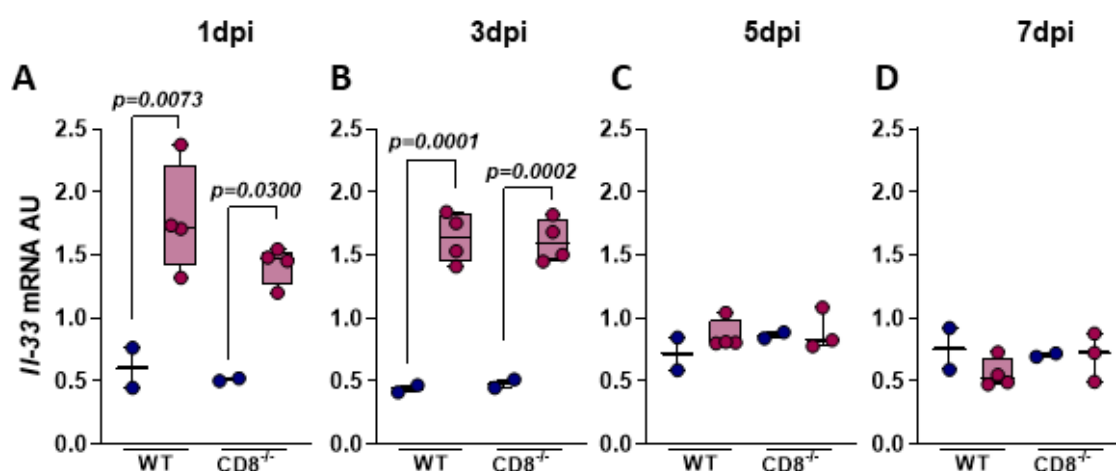


Figura 31: Expressão de IL-33 no baço de animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8^{-/-} na infecção por ZIKV. Animais C57BL/6 e C57BL/6 CD8^{-/-} foram infectados com 10^6 PFU de ZIKV via i.v. e nos dias **A)** 1, **B)** 3, **C)** 5 e **D)** 7 após infecção o baço foi coletado e a expressão de *IL-33* avaliada por RT-qPCR. Resultados em unidades arbitrárias (AU) da expressão relativa de *β-actina*. Dados representativos de pelo menos 3 experimentos com 3 animais em cada grupo. T-test foi utilizado para a análise estatística.

ST2, o receptor para a IL-33, é altamente expresso em células Treg, enquanto que em células T CD8, essa expressão é consideravelmente menor²⁴². A expressão de ST2, bem como de outros importantes marcadores celulares (CD62L, CXCR3, CX3CR1, Ly6C, KLRG1, FasL, CD127 e CTLA4) foi analisada nas populações de células T CD8⁺ total e nas T CD8⁺Foxp3⁺, e quando conveniente, analisados também em células Treg do baço de animais C57BL/6 controles e 15 dias após infecção. Para a realização de múltiplas comparações, ao final da determinação das populações celulares em análise de citometria convencional, os dados foram submetidos à análise por diferentes combinações utilizando o plugin tSNE (*t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*) do FlowJo.

A análise comparativa da população total de células T CD8⁺ entre animais controles e infectados (Figura 32A) mostrou diferença na de expressão de alguns marcadores o que resultou em diferente espalhamento das células de acordo com os marcadores expressos nas células controles vs. infectadas (Figura 32B). Em comparação ao grupo controle, duas populações do grupo infectado foram determinadas, população 1 (Pop1) e população 2 (Pop2 -Figura 32C).

A população 1 compreende células que expressam diferencialmente CXCR3, Ly6C e FasL, sendo CXCR3^{Low}Ly6C^{High}FasL^{High}, característico de células de memória tardia²⁴³, enquanto que os níveis de expressão dos outros marcadores permaneceram semelhantes dentro da população de CD8 total. Por outro lado, a população 2, que no gráfico de tSNE é mais distante de outras populações celulares, apresentam uma grande variedade de expressão dos marcadores em comparação às células T CD8⁺ total, sendo estas CD62L^{Lo}CX3CR1^{Hi}Ly6C^{Hi}KLRG1^{Hi}ST2^{Lo}FasL^{Lo}CD127^{Lo}CTLA4^{Lo}, fenótipo relacionado à células efetoras¹⁵⁷.

Foi realizada por t-SNE a análise comparativa entre T CD8⁺Foxp3⁺ de animais controles e ZIKV com T CD8⁺ total de controle e ZIKV, respectivamente (Figura 33A). Células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais controles expressam baixos níveis de todos os marcadores analisados em comparação às células T CD8⁺ totais de animais controles (Figura 33B). O mesmo foi observado para as células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais infectados em comparação as células CD8 totais de animais infectados (Figura 33C). Portanto, dentro da população de células T CD8⁺ totais, controles ou ZIKV, as células T CD8⁺Foxp3⁺ apresentam menos expressão de todos os marcadores analisados.

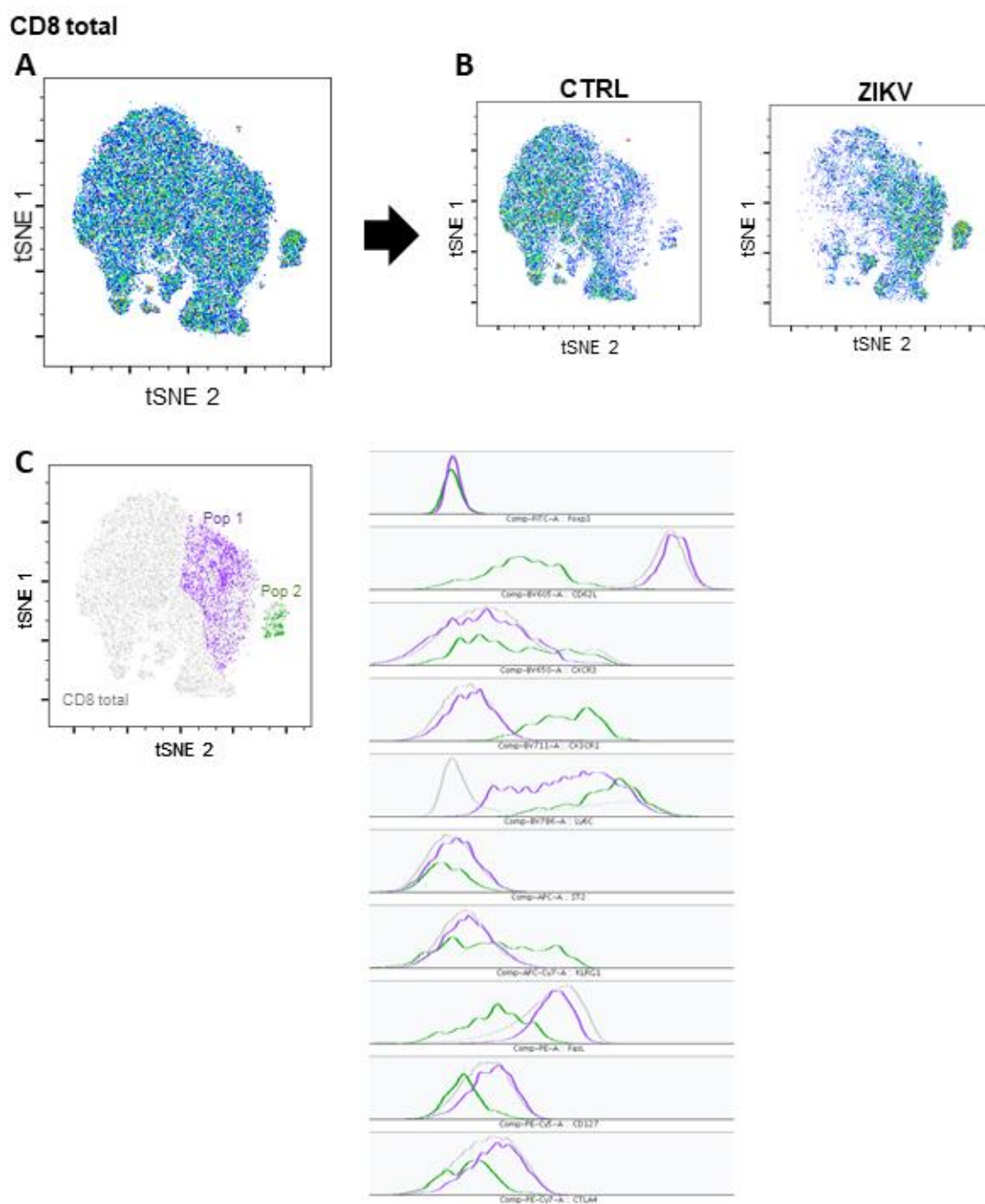


Figura 32: Perfil diferencial de células T CD8⁺. Animais C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10^6 PFU de ZIKV via i.v. e no dia 15 após infecção o baço foi coletado e submetido a marcação com diferentes anticorpos e adquiridos em citometria de fluxo. Os dados adquiridos foram analisados utilizando a ferramenta t-SNE do software FlowJo. Para esta análise foi comparado células T CD8⁺ totais dos animais controles e infectados com ZIKV. **A)** Gráfico representativo da distribuição de todas as células T CD8⁺ analisadas neste experimento de acordo com a expressão dos marcadores apresentados em **C**. **B)** À esquerda, gráfico representativo das populações 1 e 2 (pop) que estão presentes no grupo infectado e ausentes no grupo controle. À direita, histograma com a expressão dos marcadores das populações 1 (em roxo) e 2 (em verde) em relação a expressão total em células T CD8⁺.

CD8 foxp3⁺ CTRL e ZIKV vs. CD8 total

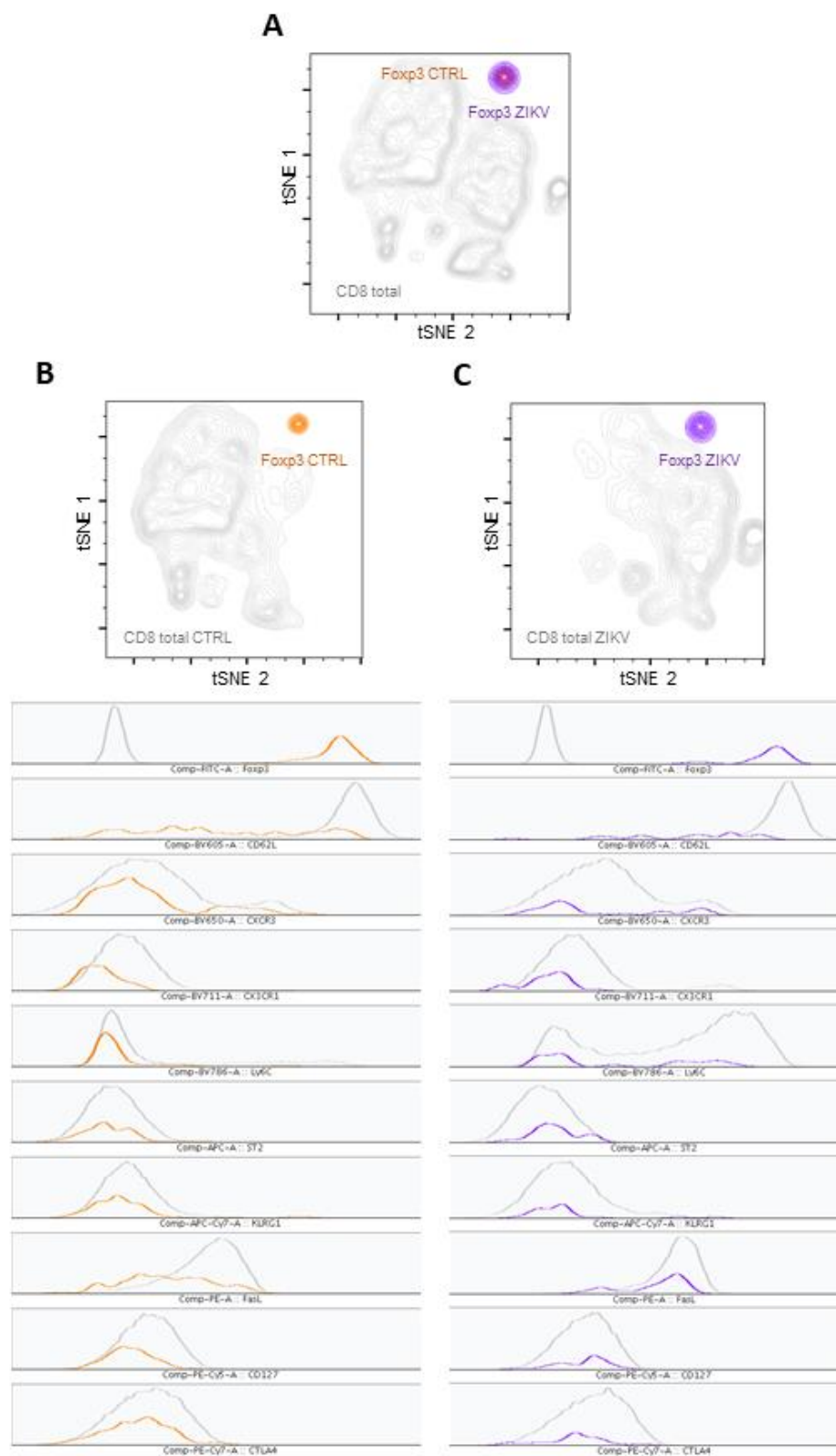


Figura 33: Perfil das células T CD8⁺Foxp3⁺ naïve e pós infecção por ZIKV. Animais C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10⁶ PFU de ZIKV via i.v. e no dia 15 após infecção o baço foi coletado e submetido a marcação com diferentes anticorpos e adquiridos em citometria de fluxo.

Os dados adquiridos foram analisados utilizando a ferramenta t-SNE do software FlowJo. Para esta análise foi comparado células T CD8⁺Foxp3⁺ controles e infectados com ZIKV em relação às células T CD8⁺Foxp3⁺ totais. **A)** Gráfico representativo da distribuição das populações de células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais naïve e infectados em relação a células T CD8⁺ totais. **B)** Ao topo, gráfico representativo da análise dentro do grupo controle das células T CD8⁺Foxp3⁺ em relação as células totais T CD8⁺. Abaixo, histograma mostrando o nível de expressão de cada marcador utilizado. **C)** Ao topo, gráfico representativo da análise dentro do grupo infectado das células T CD8⁺Foxp3⁺ em relação as células totais T CD8⁺. Abaixo, histograma mostrando o nível de expressão de cada marcador utilizado.

A seguir, comparamos células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais controles com células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais infectados com ZIKV (Figura 34A). Esta análise mostrou uma grande diferença de expressão de marcadores entre as células T CD8⁺Foxp3⁺ dos animais CTRL vs. ZIKV (Figura 34B), tendo sete diferentes populações celulares determinadas nesta comparativa. Dentre elas, populações 1 e 2 estão presentes no grupo controle, enquanto que, populações 3 a 7 estão presentes apenas nos animais infectados (Figura 34C).

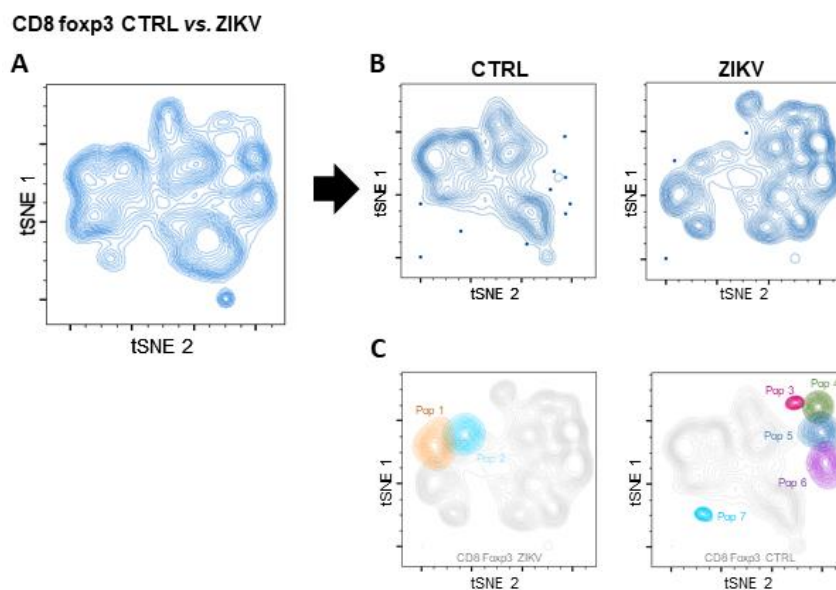


Figura 34: Diferentes populações de células T CD8⁺Foxp3⁺ entre animais naïve e pós infecção por ZIKV. Animais C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10⁶ PFU de ZIKV via i.v. e no dia 15 após infecção o baço foi coletado e submetido a marcação com diferentes anticorpos e adquiridos em citometria de fluxo. Os dados adquiridos foram analisados utilizando a ferramenta t-SNE do software FlowJo. Para esta análise foi comparado células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais controles com as de animais infectados com ZIKV. **A)** Gráfico representativo da distribuição das células T CD8⁺Foxp3⁺ totais. **B)** Gráfico representativo da distribuição das células T CD8⁺Foxp3⁺ dos animais controles (à esquerda) e infectados (à direita). **C)** A partir da comparação entre as distribuições apresentadas em B, foi possível detectar 2 populações células presentes apenas no grupo controle (à esquerda) e 5 presentes no grupo infectado (à direita).

Em análise minuciosa das populações de células T CD8⁺Foxp3⁺ observamos que as populações 1 e 2 expressam baixíssimos níveis de todos os marcadores aqui avaliados (Figura 35), isso inclui baixa expressão de marcadores de homing, memória e migração, como CD62L, CXCR3 e CD127, efetores como CX3CR1 e KLRG1, citolítico como FasL, ativação celular como Ly6C, inibição como CTLA4 e, também, ST2.

CD8 foxp3 CTRL vs. ZIKV

A

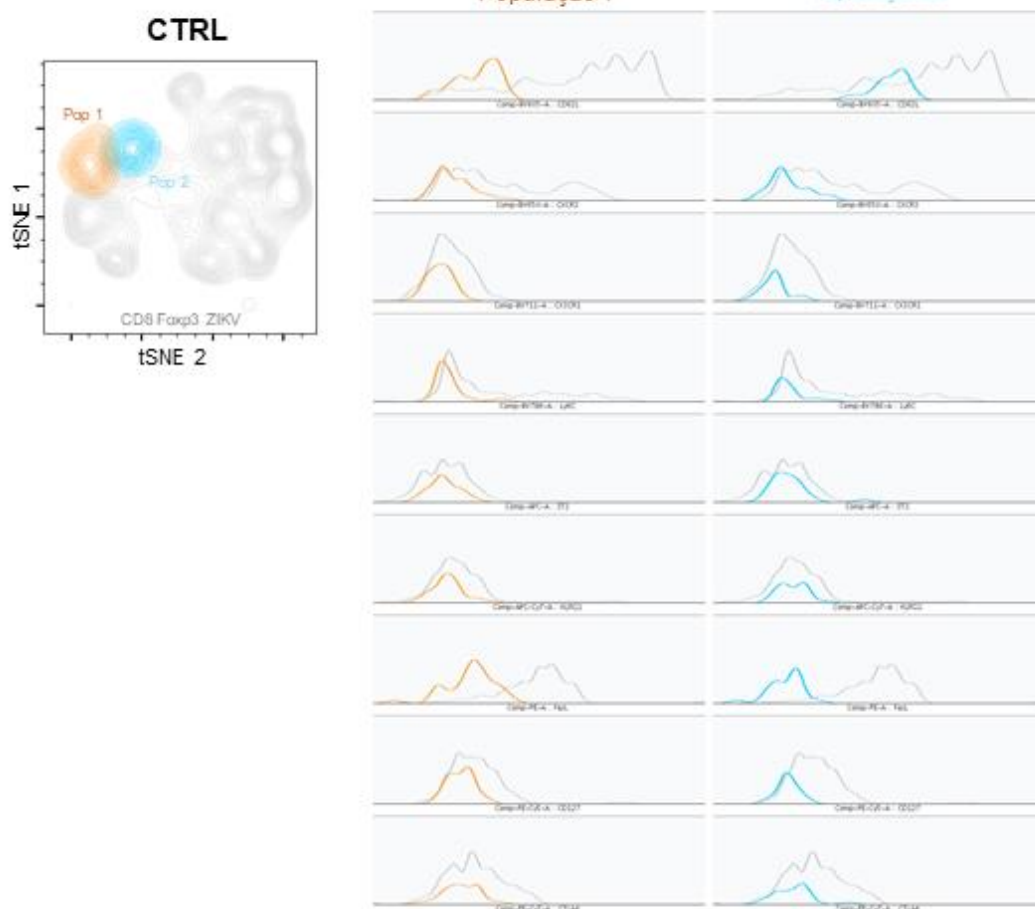


Figura 35: Populações de células T CD8⁺Foxp3⁺ presentes apenas em animais *naïves*. O baço de animais C57BL/6 Foxp3GFP foi coletado e submetido a marcação com diferentes anticorpos e adquiridos em citometria de fluxo. Os dados foram analisados utilizando a ferramenta t-SNE do software FlowJo. À esquerda, Gráfico da distribuição das células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais infectados além da representação das duas populações presentes apenas em animais controles. Ao centro e à direita, histograma de diferente expressão dos marcadores nas populações 1 e 2, respectivamente.

Enquanto que as populações destacadas no grupo controle apresentaram baixos níveis de todos os marcadores, as populações que surgem no grupo infectados apresentam diferentes perfis de expressão (Figura 36). População 3 apresenta $CD62L^{Lo}CXCR3^{Hi}Ly6C^{hi}ST2^{Hi}FasL^{Hi}CD127^{Lo}CTLA4^{Hi}$ (Figura 36A), população 4, $CD62L^{Hi}CXCR3^{Hi}CX3CR1^{Lo}Ly6C^{hi}ST2^{Hi}KLRG1^{Hi}CD127^{Lo}CTLA4^{Lo}$ (Figura 36B) população 5, $CD62L^{Hi}CXCR3^{Hi}Ly6C^{hi}ST2^{Lo}FasL^{Hi}CD127^{Lo}CTLA4^{Lo}$ (Figura 36C), população 6, $CD62L^{Hi}Ly6C^{Hi}FasL^{Hi}$ (Figura 35D), e população 7, $CD62L^{Lo}CXCR3^{Lo}Ly6C^{hi}ST2^{Lo}KLRG1^{Lo}CD127^{Lo}$ (Figura 36E). Os marcadores que não foram diferentemente expressos nestas populações celulares, não foram citados aqui.

O próximo passo foi analisar as diferenças entre as células $Foxp3^+$ totais, isso inclui células CD4 e as CD8 reguladoras (Figura 37). Dentro de $Foxp3^+$ total, células de animais CTRL e ZIKV foram separadas (Figura 37A e B). Células CD4 e CD8 $Foxp3^+$ de animais CTRL expressam níveis similares de praticamente todos os marcadores analisados, exceto pela maior expressão de ST2 e KLRG1 por células T $CD4^+Foxp3^+$, e maior expressão de CD127 e CTLA-4 pelas células T $CD8^+Foxp3^+$ (Figura 37C). Já no grupo infectados, células T $CD4^+Foxp3^+$ parecem perder a expressão de ST2, enquanto que a diferença no nível de expressão de FasL, CD127 e CTLA4 se tornam ainda maior nas células T $CD8^+Foxp3^+$ (Figura 38D). Diferenças estas que podem ser melhor observadas na figura 38A, comparativa entre T $CD8^+Foxp3^+$ de CTRL e ZIKV vs. $Foxp3$ total e, figura 38B, comparativa entre T $CD4^+Foxp3^+$ de CTRL e ZIKV vs. $Foxp3$ total.

Até aqui, descrevemos diferentes populações de células T $CD8^+Foxp3^+$ presentes naturalmente no baço de animais controles e, também, as 5 diferentes populações que surgem após a infecção por ZIKV. Podemos destacar a expressão de FasL e Ly6C como característica chave das populações induzidas após a infecção.

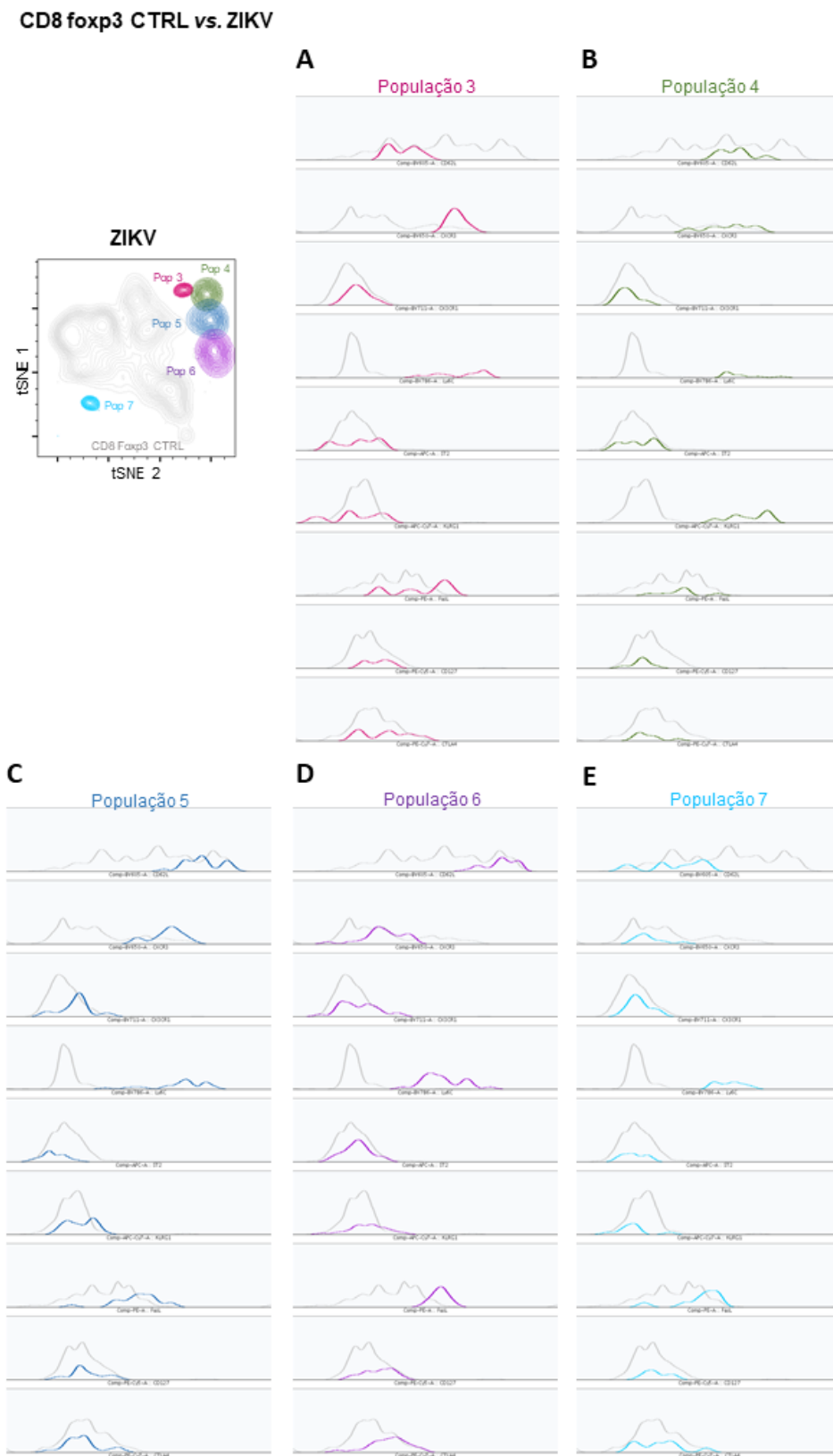


Figura 36: Populações de células T CD8⁺Foxp3⁺ presentes apenas em animais infectados com ZIKV. Animais C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10⁶ PFU de ZIKV via i.v. e no dia 15 após infecção o baço foi coletado e submetido a marcação com diferentes anticorpos e

adquiridos em citometria de fluxo. Os dados foram analisados utilizando a ferramenta t-SNE do software FlowJo. No topo à esquerda, gráfico da distribuição das células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais infectados além da representação das duas populações presentes apenas em animais controles. **A-E)** Histograma da diferente expressão dos marcadores nas populações 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente.

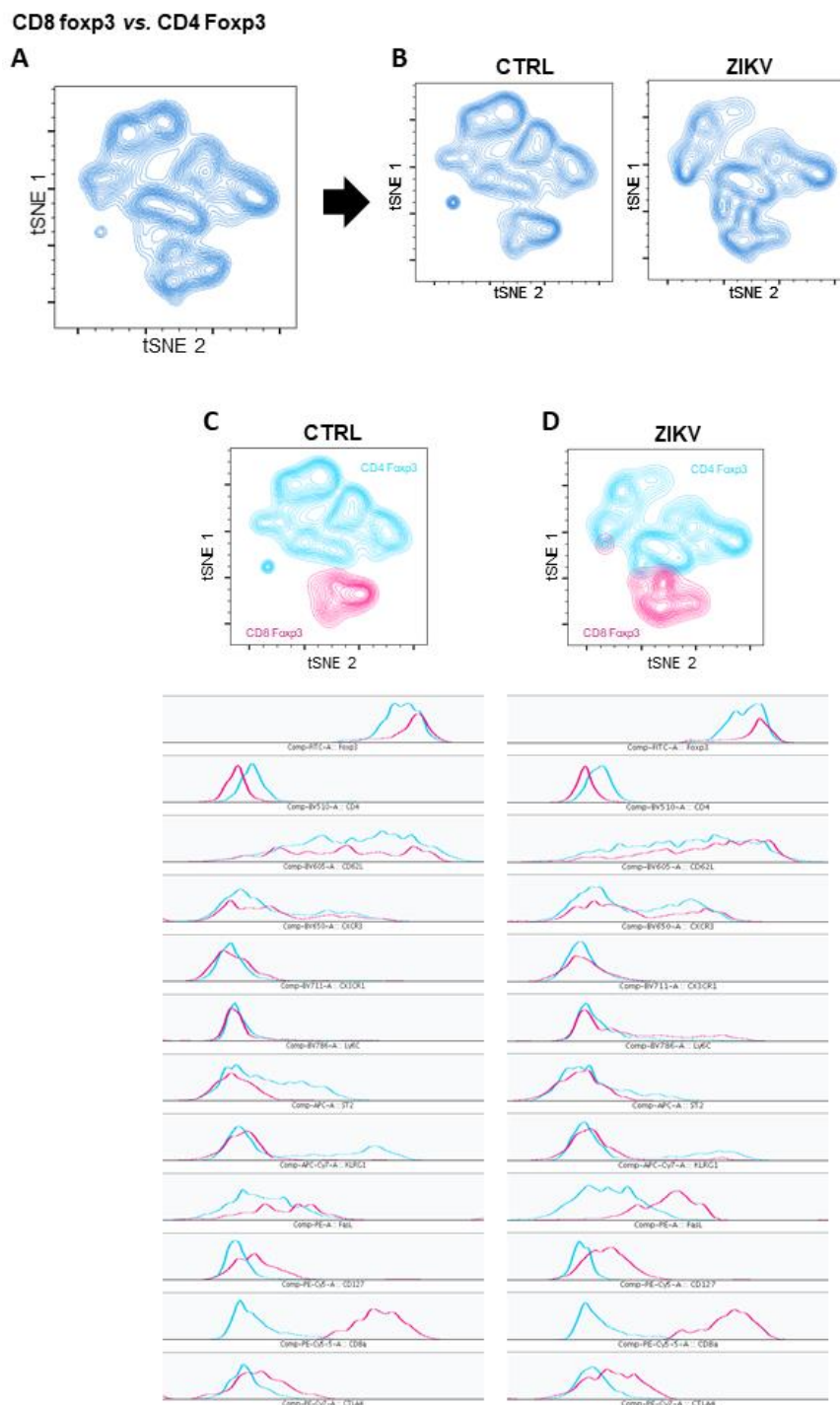


Figura 37: Expressão diferencial entre células T CD8⁺Foxp3⁺ e T CD4⁺Foxp3⁺. Animais C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10⁶ PFU de ZIKV via i.v. e no dia 15 após infecção o baço foi coletado e submetido a marcação com diferentes anticorpos e adquiridos em citometria de fluxo. Os dados foram analisados utilizando a ferramenta t-SNE do software FlowJo. Para esta

análise foi comparado células T CD8⁺Foxp3⁺ e CD4⁺Foxp3⁺ de animais controles com as de animais infectados com ZIKV. **A)** Gráfico representativo da distribuição de todas as células T Foxp3⁺. **B)** Gráfico representativo da distribuição das células Foxp3⁺ dos animais controles (à esquerda) e infectados (à direita). **C)** Gráfico representativo da expressão dos marcadores de células T CD8⁺Foxp3⁺ em comparação às células T CD4⁺Foxp3⁺ de animais controles. **D)** Gráfico representativo da expressão dos marcadores de células T CD8⁺Foxp3⁺ em comparação às células T CD4⁺Foxp3⁺ de animais infectados com ZIKV.

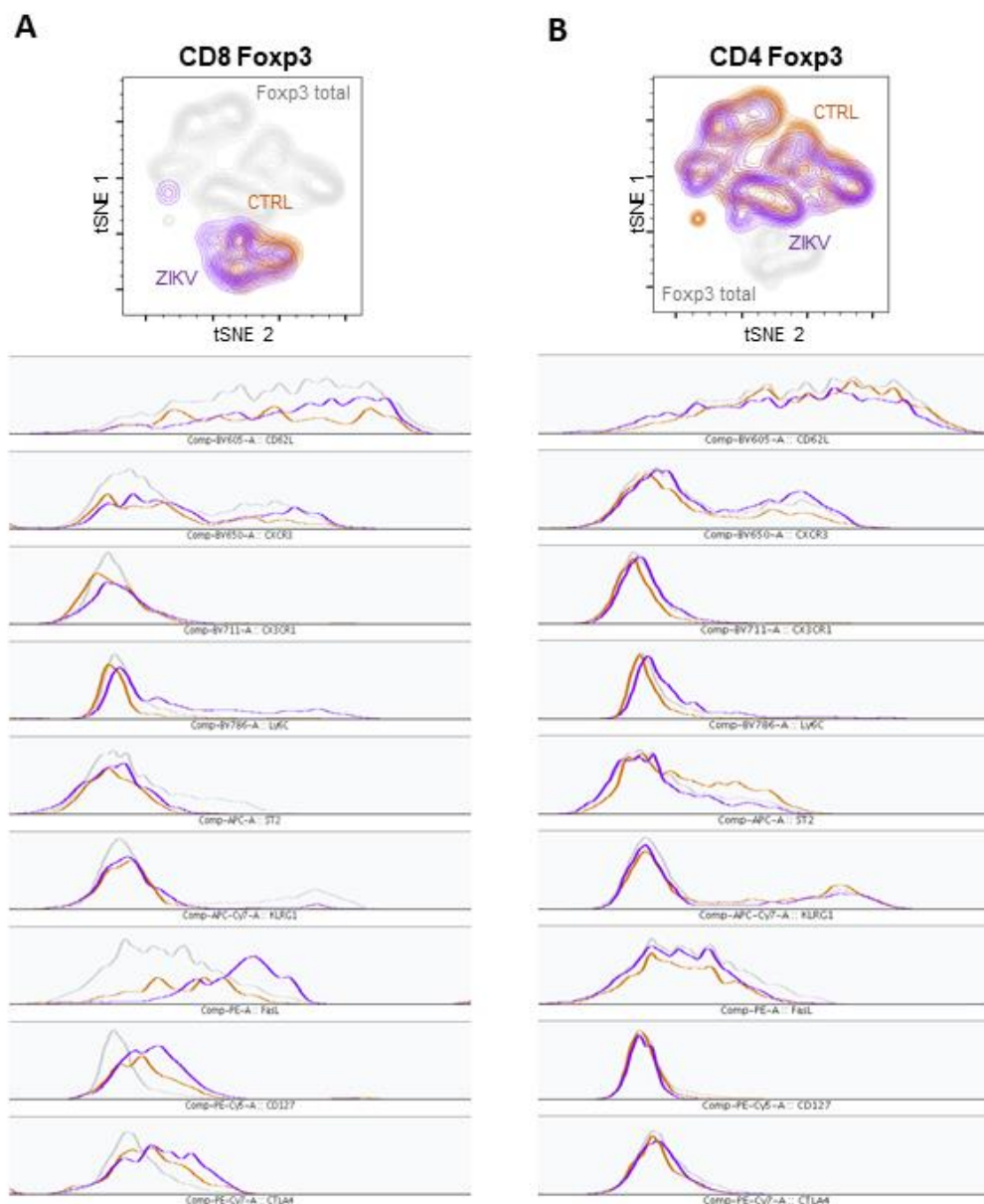


Figura 38: Expressão diferencial entre células T Foxp3⁺. Animais C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10⁶ PFU de ZIKV via i.v. e no dia 15 após infecção o baço foi coletado e submetido a marcação com diferentes anticorpos e adquiridos em citometria de fluxo. Os dados foram analisados utilizando a ferramenta t-SNE do software FlowJo. Para esta análise foi comparado **A)** células T CD8⁺Foxp3⁺ naïve e infectado em comparação às células Foxp3⁺ total e **B)** células T CD4⁺Foxp3⁺ naïve e infectado em comparação às células Foxp3⁺.

4.2.5. Células T CD8⁺Foxp3⁺ possuem funções ambíguas

Embora tenhamos mostrado que as células T CD8⁺foxp3⁺ estão aumentadas em animais infectados por ZIKV desde o primeiro dia de infecção e que esta população celular é heterogênea, ainda não sabíamos quais as reais funções destas células em nosso modelo. Portanto, a fim de se avaliar os efeitos das células T CD8⁺Foxp3⁺ sobre a infecção por ZIKV, realizamos transferência adotiva de células T CD8⁺Foxp3⁺ ou Foxp3⁻ provenientes de animais controles ou de animais com 30 dias de infecção por ZIKV (Figura 39A).

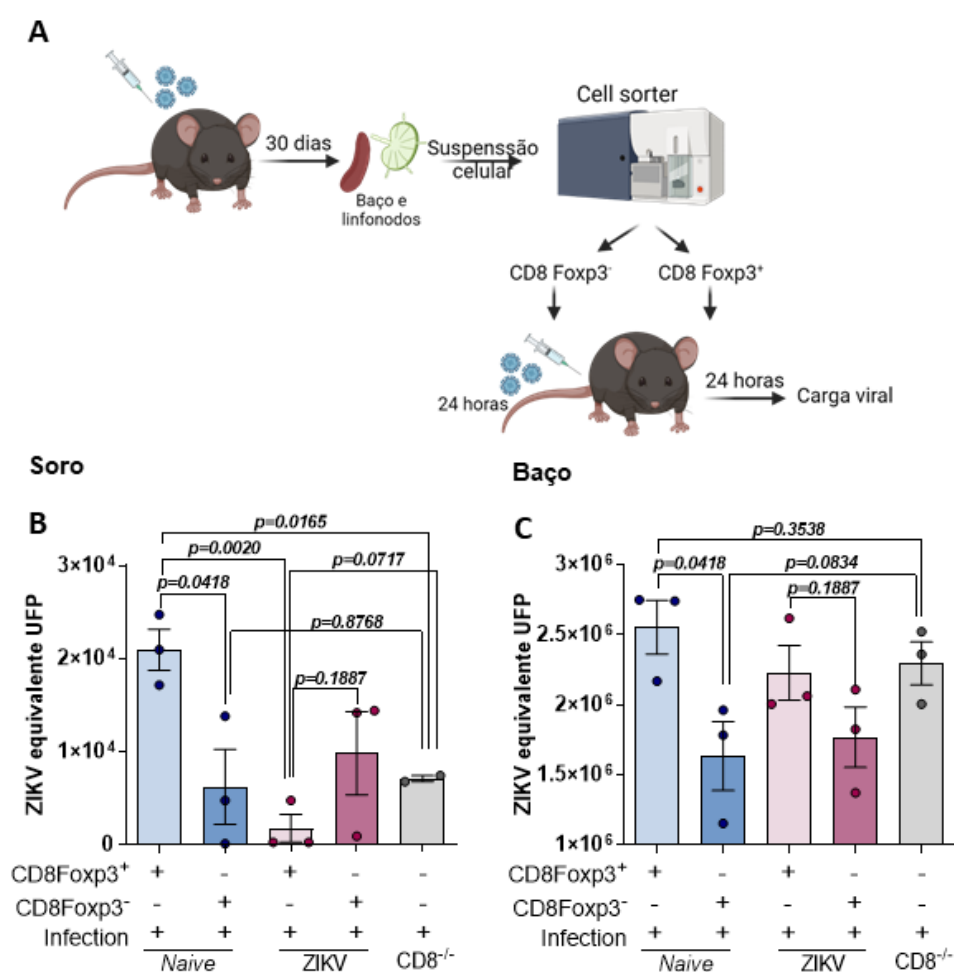


Figura 39: Função das células T CD8⁺Foxp3⁺. A) Animais C57BL/6 Foxp3GFP foram infectados com 10⁶ PFU de ZIKV via i.v. e após 30 dias o baço e linfonodos foram coletados e submetidos a separação por *cell sorting*. Após a separação, células T CD8⁺Foxp3⁺ e T CD8⁺Foxp3⁻ foram transferidas para animais C57BL/6 CD8^{-/-} e 1 dia após estes animais foram infectados. Após 24 horas, os animais foram eutanasiados e soro e baço coletados para quantificação de RNA viral por RT-qPCR. Gráfico da quantificação de RNA viral por RT-qPCR no B) soro e no C) baço dos animais receptores das células. Dados representativos de pelo menos 3 experimentos com 3 animais em cada grupo. One-way anova foi utilizado para a análise estatística.

Vale ressaltar que, uma vez que não é possível o isolamento de células provenientes de animais virêmicos em “*cell sorter*” de classificação de segurança 1 (NB1), devido a possível formação de aerossóis e potencial contaminação do ambiente, determinamos para estes experimentos, o tempo de 30 dias após a infecção, em que já não é mais possível a detecção de material genético viral, tampouco partículas virais infecciosas, no baço de animais C57BL/6 Foxp3GFP.

Animais C57BL/6 CD8^{-/-} foram usados como receptores para as células T CD8⁺Foxp3⁺ (3000 células transferidas) ou Foxp3⁻ (10⁶ células transferidas) e infectados 24h após a transferência celular, avaliamos a carga viral no baço e soro destes animais 1 dia após a infecção (Figura 39A).

No soro, animais que receberam células T CD8⁺Foxp3⁺ proveniente de doadores controles apresentaram maior carga viral comparado à aquelas que receberam T CD8⁺Foxp3⁻ (Figura 39B, do inglês, *naïve*) e, interessante, maior também do que os animais CD8^{-/-} infectados. Aqui usamos como controle para este experimento, animais CD8^{-/-} com 1 dia de infecção. Quando avaliamos o grupo de animais que receberam tanto células T CD8⁺Foxp3⁺, quanto Foxp3⁻, de animais previamente infectados com ZIKV, não observamos diferença de viremia entre eles e também em comparação aos animais CD8^{-/-} infectados. Outro ponto importante que vale ressaltar, é a grande diferença entre os que animais que receberam células T CD8⁺Foxp3⁺ *naïve* dos que receberam T CD8⁺Foxp3⁺ ZIKV, o que nos sugere efeitos diversos das células T CD8⁺Foxp3⁺.

Embora grandes diferenças tenham sido obtidas como descritas acima nas análises de viremia, poucas foram as observadas com a carga viral no baço destes animais (Figura 39C). Mais uma vez, animais que receberam células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais *naïves*, apresentam maior carga viral comparado àqueles que receberam células T CD8⁺Foxp3⁻. Nenhuma diferença foi encontrada entre animais que receberam células de animais previamente infectados e animais CD8^{-/-}, tampouco diferença entre os que receberam células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais *naïve* e ZIKV.

Aqui mostramos que células T CD8⁺Foxp3⁺ reguladoras podem exercer algum papel durante a infecção por ZIKV, seja esse por auxiliar de certa forma na replicação viral (T CD8⁺Foxp3⁺ *naïve*) ou seja por permitir ótimo funcionamento do sistema imune contra a replicação viral, ou até mesmo por promover a eliminação de células infectadas (T CD8⁺Foxp3⁺ ZIKV).

DISCUSSÃO

Nossos resultados evidenciam um importante papel dos neutrófilos e de células T CD8⁺ reguladoras durante a infecção por ZIKV. Neste trabalho, mostramos que ZIKV infecta e se replica dentro de neutrófilos e, possivelmente, usa estas células como reservatório para replicação e disseminação viral. Aqui, também mostramos que a infecção por ZIKV induz o aumento de uma rara população de células T CD8⁺ reguladoras já no primeiro dia após a infecção, e estas células permanecem por até pelo menos 30 dias mesmo após completa eliminação viral.

Nos últimos anos a literatura acerca do papel dos neutrófilos e células T CD8⁺ reguladoras em infecções virais veem crescendo, o que nos ajudou na compreensão dos nossos resultados sobre os possíveis papéis destas células no modelo de infecção por ZIKV.

Neutrófilos possuem funções bem descritas e estabelecidas em infecções fúngicas e bacterianas. Indivíduos que com Doença Granulomatosa Crônica e Neutropenia Congênita Grave, em que apresentam déficit de função, ou reduzido número de neutrófilos, sofrem de recorrentes e severas infecções fúngicas e bacterianas^{244,245}, porém isto não é válido para infecções virais. Por muito tempo as funções dos neutrófilos em infecções virais foram negligenciadas, apesar de os primeiros estudos nessa área datarem de meados dos anos 70²⁴⁶⁻²⁴⁸. Como em outras infecções, a atividade antiviral dos neutrófilos é controversa e pode ser benéfica e detrimento para o hospedeiro.

Em infecção com o vírus neurotrópico de hepatite murina (JHMV) e herpes simplex vírus (HSV)-1 os neutrófilos apresentam importante papel no controle da replicação viral, uma vez que na ausência destas células, os animais infectados apresentaram aumento da replicação viral e taxa de mortalidade^{249,250}. Neutrófilos também são importantes no controle da infecção pelos vírus Marburg e Ebola²⁵¹. Entretanto, em certos casos, as respostas protetoras contra infecções virais estão associadas com permeabilidade e dano tecidual e febre hemorrágica²⁴⁹⁻²⁵¹, pneumonia e síndrome do desconforto respiratório agudo em infecções por vírus respiratório¹²³, dores em articulações e mialgia em infecções por CHIKV²³⁶.

Contudo, neutrófilos podem se comportar de forma diferente, como é o caso em infecções causadas pelo vírus H1N1 e H5N1 influenza vírus A e WNV, em que os

neutrófilos infectados, a princípio não produzem resposta imune eficaz para a eliminação viral e servem como células susceptíveis para a replicação e disseminação viral^{142,143,235}. Em infecções por arboviroses, neutrófilos são recrutados por sítio de infecção, auxiliando na promoção de inflamação e recrutamento de células mieloides, as quais servem como reservatório e transportadores de vírus¹²⁵.

A infecção de adultos por DENV, um flavivírus antigenicamente relacionado ao ZIKV, induz aumento da expressão de CD66b em neutrófilos, marcador relacionado a ativação celular e formação de NETs. Além disso, pacientes com dengue hemorrágica grave apresentaram altos níveis de IL-8, TNF- α e NETs comparados a pacientes com a forma mais leve da infecção e indivíduos saudáveis²⁵². Os neutrófilos de pacientes com a forma mais branda, aparentemente não produzem NETs, ou possuem mecanismos mais eficazes de eliminar ou, talvez, inibir as NETs²⁵². Moreno-Altamirano e colaboradores (2015), mostraram que a infecção de neutrófilos *in vitro* com o sorotipo 2 de DENV interfere com a formação das NETs por reduzir a expressão de Glut-1 e, conseqüentemente, a captação de glicose²³⁴.

Sabendo-se da relevância dos neutrófilos como efetores antivirais, promotores de dano tecidual e agravamento de quadro clínico, ou por serem responsáveis por disseminação viral, aqui nos questionamos qual seria a função dos neutrófilos na infecção por ZIKV.

Mostramos por diferentes técnicas que ZIKV infecta neutrófilos e consegue se replicar no interior destas células produzindo partículas virais capazes de infectar outras células. Além disso, vimos que a infecção não altera a meia-vida dos neutrófilos, e também, não induz produção de ERO *in vitro*. Adicionalmente, isso acontece tanto em neutrófilos de animais C57BL/6, resistentes, quanto de animais SJL, susceptíveis à infecção por ZIKV⁶⁴. Portanto, a infecção e replicação no interior de neutrófilos não está relacionada a susceptibilidade e resistência ao ZIKV.

Mostramos também que, *in vitro*, ZIKV infecta e se replica no interior de neutrófilos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, sem indução de ERO e liberação de NETs. Porém, com redução da capacidade fagocítica, como mostrado para neutrófilos murinos. Demonstramos que a não liberação de NETs após a infecção pelo ZIKV não se dá a partir de mecanismo de evasão viral. Pois, a infecção utilizando ZIKV inativado pelo calor, também não induz liberação de NETs. Entretanto, tanto infecção com ZIKV quanto

ZIKV inativado reduzem a capacidade de liberação de NETs após estímulo com PMA, como observado pela diminuição da marcação de histona H2A/H2B.

Vírus possuem mecanismos de evasão da produção de ERO e NETs. DENV-2 possui capacidade de inibir a liberação de NETs por reduzir a expressão de Glut1 e, conseqüentemente, a redução da captação de glicose^{234,253}. Glicoproteína do envelope viral do HIV induz a produção de IL-10 por células dendríticas para a inibição da formação de NETs¹³⁸ e, além disso, IL-10 também suprime a produção de ERO a partir da inibição da produção de ERO dependente da ativação de NFκB²⁵⁴. Vimos que indivíduos infectados por ZIKV possuem 10 vezes mais IL-10 no soro do que indivíduos saudáveis. Entretanto, mais experimentos são necessários para afirmarmos que ZIKV possui algum mecanismo eficaz para evadir das funções efetoras dos neutrófilos *in vivo*.

Vimos que, embora sem produção de ERO e indução de morte celular, a infecção por ZIKV altera a capacidade oxidativa, frente ao PMA, e fagocítica de neutrófilos. Cogitamos se este fenótipo se daria pela redução da expressão do gene de Glut1, como apresentado por Moreno-Altamirano em relação a liberação de NETs²³⁴, e interessante, embora não significativa, este gene tenha apresentado pequena redução no início da infecção, esta redução não é mantida ao longo de 18 horas de infecção.

Mostramos que ZIKV induz o aumento na expressão de vários genes relacionados com invasão viral (*Axl*) e resposta imune (*Ifnb1*, *Nos2* e *Tnfa*) e, embora a expressão de *Ifnb1* esteja aumentado, nenhuma diferença foi detectada na expressão do receptor de IFN, IFNAR, nos neutrófilos infectados *in vitro*, e tampouco, nos neutrófilos de peritônio de animais infectados *in vivo*.

Além disso, a infecção *in vitro* por ZIKV não induz a expressão de marcadores de ativação celular, inclusive MHC-I. Entretanto, neutrófilos recuperados do peritônio de animais infectados, apresentam altos níveis de CD80, CD86, MHC-I e MHC-II. Neutrófilos e macrófagos de infiltrado inflamatório do SNC de animais IFNAR^{-/-} e C57BL/6 também apresentam aumento da expressão gênica de *Mhc*, *Cd80*, *Cd86*, *Cd68* e *Cd40*¹¹¹. O que nos levar a crer que o microambiente celular possa estar envolvido com a ativação dos neutrófilos frente a infecção por ZIKV.

Embora tenhamos mostrado que ZIKV infecta neutrófilos de diferentes linhagens de camundongos e também neutrófilos humanos, isso não prova que ZIKV

infecta neutrófilos durante uma infecção *in vivo* e que tenha alguma relevância na biologia da infecção. Sabendo-se que IFN do tipo I parece não exercer muitas funções sobre neutrófilos durante a infecção por ZIKV, lançamos mão de um modelo de infecção amplamente utilizado em experimentos com flavivírus (IFNAR^{-/-}) e provamos por duas diferentes técnicas que os neutrófilos são infectados durante a infecção *in vivo*.

A transmissão do ZIKV, como citada na introdução, pode ocorrer por várias formas, porém a mais comum e de mais rápida disseminação é pela picada do mosquito *Aedes aegypti* infectado³⁶⁻³⁸. Sabe-se que a saliva de mosquito vetor é composta por várias moléculas que possuem capacidade de alterar a resposta imune²⁵⁵ e celularidade local²³⁸ com aumento extraordinário no número de neutrófilos poucas horas após a picada^{125,238}.

Hastings e colaboradores (2019), mostraram que a proteína NeSt1 (fator 1 estimulador de neutrófilos) presente na saliva de *Aedes aegypti* estimula neutrófilos no sítio da infecção promovendo imunomodulação no microambiente e, conseqüentemente, permitindo alta replicação viral e aumentando a patogênese da infecção por ZIKV²⁵⁵. Estes achados vão ao encontro dos apresentados por Pinggen e colaboradores em 2016, que mostrou que a saliva do mosquito promove o recrutamento de neutrófilos, que por sua vez auxiliam na amplificação do recrutamento de células mieloides a partir da produção de IL-1 β e CCL2, sendo estas células mieloides reservatório para a disseminação viral. Porém, vale ressaltar que nenhum destes trabalhos cogitaram a possibilidade de os neutrófilos, as primeiras células a chegarem no local da picada, também servirem como reservatório para o ZIKV.

Aqui, mostramos que 24 horas após infecção intradérmica com ZIKV, é possível detectar neutrófilos PBMCs infectadas no sangue. Além disso, a infecção na presença de saliva resulta em maior viremia. Como descrito previamente, ZIKV infecta mononucleares e se replica no interior destas células^{125,256,257}. Aqui sugerimos que, além dos monócitos, os neutrófilos também exerçam tal função. Vale destacar que a frequência de neutrófilos no sangue de humanos e camundongos é muito distinta. Enquanto no sangue humano neutrófilos compreendem cerca de 50-70% dos leucócitos, em camundongos essa porcentagem cai para 10-25%²⁵⁸. Portanto, é difícil avaliar a verdadeira relevância dos neutrófilos na infecção por ZIKV utilizando modelos de infecção em camundongos.

Portanto, lançamos mão de diferentes abordagens, como a depleção e enriquecimento de neutrófilos para mostrar os efeitos destas células na infecção por ZIKV. Utilizando o anticorpo anti-Gr1 previamente à infecção depletando tanto neutrófilos quanto monócitos²⁵⁹, observamos drástica redução da viremia, o que nos mostra que ambas as populações celulares são relevantes para a replicação viral. Para focarmos nos neutrófilos, utilizamos anticorpo anti-Ly6G, específico para depleção de neutrófilos. Observamos redução da viremia nos animais depletados de neutrófilos, embora em menor amplitude. Além disso, o tratamento prévio com G-CSF recombinante humano para induzir o aumento dos neutrófilos previamente à infecção, resulta em maior viremia. Mais uma vez, nossos dados solidificam nossa hipótese de que os neutrófilos também são células-alvo para a replicação viral e patogênese da infecção por ZIKV.

A partir de então, sabendo-se que na infecção pelo vírus H5N1 IAV os neutrófilos exercem papel de cavalos de Tróia pra placenta¹⁴², cogitamos se os neutrófilos poderiam exercer papel similar durante a infecção congênita de ZIKV. Infectamos neutrófilos *in vitro* e transferimos para animais prenhes. Vinte e quatro horas após, conseguimos detectar na placenta os neutrófilos transferidos, além disso, detectamos carga viral em órgãos maternos, nas placentas e tecidos fetais. Mais uma vez, induzimos o aumento de neutrófilos utilizando G-CSF recombinante humano em camundongos prenhes previamente a infecção. No dia do nascimento, os filhotes apresentaram maior carga viral no cérebro. Estes dados reforçam a importância dos neutrófilos na biologia da infecção congênita do ZIKV.

Durante a gestação, a contagem de leucócitos é elevada²⁶⁰. Em gestações saudáveis, a função fagocítica de neutrófilos é reduzida, e este fenótipo é de grande importância na manutenção da imunossupressão para proteção do feto. Além disso, a produção de ânions superóxido por estas células está reduzido²⁶¹. Em análise de placenta termo de 3 casos de infecção por ZIKV mostrou que dentre as células CD45⁺, 40 a 80% eram neutrófilos. Duas das 3 placentas apresentaram aproximadamente aumento de 20% na frequência de neutrófilos comparados às placentas controles. Além disso, foi detectada elevada expressão de *CXCL8* no lado fetal da placenta infectada com ZIKV²³⁹.

Utilizamos os dados depositados de transcriptoma das placentas acima mencionadas²³⁹ e observamos que os genes relacionados a ativação e degranulação de

neutrófilos são regulados negativamente nas placentas infectada com ZIKV. Isso nos levou a questionar qual o perfil dos neutrófilos da placenta em nosso modelo de infecção.

Placentas de animais IFNAR^{-/-} infectados com ZIKV apresentaram aumento na frequência de neutrófilos, similar aos mostrado em placentas de humano²³⁹. Porém, em nosso modelo, vimos que estes neutrófilos apresentam perfil de ativação celular com aumento na expressão de MHC-II, CD80 e CD86. E pela primeira, até onde sabemos, mostramos que os neutrófilos da placenta de animais infectados com ZIKV expressam altos níveis de MHC-I. Interessantemente, após o isolamento destes neutrófilos, foi possível provar que eles estavam infectados com ZIKV e com carga viral equivalente à de macrófagos da placenta. Já é bem descrito que o ZIKV infecta os macrófagos e células de Hofbauer das vilosidades coriônicas da placenta^{119,120}. Porém, esta é a primeira vez na literatura em que se detecta ZIKV nos neutrófilos da placenta.

Aqui também mostramos que estes neutrófilos infectados apresentam conteúdo proteico muito similar aos neutrófilos controles, com diferença de expressão em apenas 12 proteínas dentre as 192 detectadas na proteômica. Dentre as diferentemente expressas, destacamos a Tbc1d1, Stefin B e Anexina A3 que foram mais expressas nos neutrófilos infectados com ZIKV.

Tbc1d1, bem como Tbc1d4, são fosforiladas em resposta a insulina ou contração muscular, levando a regulação da expressão de GLUT-4, e CD36 na superfície celular, conseqüentemente, aumentando a captação de glicose e ácidos graxos destas células²⁶²⁻²⁶⁵. Diferentemente do mostrado por Moreno-Altamirano e colaboradores (2015) para DENV²³⁴, a infecção por ZIKV parece não bloquear a captação energética de neutrófilos.

Stefin B, ou Cistatina B, é o principal inibidor intracelular de catepsina B e tem sido descrito por suas funções protetoras na inflamação e sepse²⁶⁶. Durante estes eventos, catepsina induz a expressão de caspase 11 e liberação de IL-1 β e IL-18 no soro e, portanto, na ausência de Stefin B, a expressão de catepsinas não é inibida, resultando no aumento excessivo destas citocinas e caspase²⁶⁶. Stefin B é relacionada no controle de morte celular induzida por catepsinas²⁶⁷. Manipulação da expressão de catepsinas e cistatinas parece estar envolvida com mecanismos de invasão celular e evasão da resposta imune. Em infecções virais como por Ebola, catepsina B auxilia na entrada, mas não na replicação viral²⁶⁸⁻²⁷⁰. Por outro lado, a infecção por Ectromelia vírus suprime tanto catepsinas quanto cistatinas prejudicando a função de células dendríticas e possibilitando

a replicação viral²⁷¹. Aqui mostramos que a manutenção da expressão de Stefin B em neutrófilos infectados por ZIKV pode estar relacionado com a manutenção da meia-vida destas células durante a infecção. Entretanto, mais experimentos são necessários para esta afirmação.

Em nossos resultados de proteômica, foi possível detectar vários membros da família de proteínas Anexina A, porém apenas a A3 foi expressa diferentemente entre os grupos analisados. Esta família de proteínas apresentam estruturas muito similares, porém com diferentes funções, exercendo atividade pró ou anti-inflamatória^{272,273}. Anexina A1 foi descrita em neutrófilos de placenta e está relacionada com a indução de células T produtoras de IL-10 na placenta, auxiliando na manutenção da imunossupressão local²⁷⁴. E o aumento da expressão desta molécula, Anexina A1, já foi descrita em infecção por ZIKV em linhagem celular LLC-MK2²⁷⁵. Além disso, anexina A2 possui capacidade de inibir as vias de sinalização de ERO e IL17A e, conseqüentemente, reduzindo a resposta inflamatória em modelo experimental²⁷⁶.

Por outro lado, a Anexina A3, também conhecida como lipocortina tem sido descrita na proliferação, invasividade e metástase de tumores, além de seu papel em angiogênese²⁷⁷. Interessantemente, Anexina A3 é associada aos grânulos citoplasmáticos de neutrófilos e são translocados para a membrana plasmática durante ativação celular²⁷⁸. Além disso, esta proteína participa em atividades associadas a membrana, como transdução de sinais, transporte de vesículas, fusão de membranas e transporte de canais de íons²⁷⁷.

Anexina A3 é altamente expressa em células infectadas com HCV, e a proteína NS5 viral está associada com essa expressão. Interessantemente, anexina A3 não é crucial para a replicação viral e sim para a produção e secreção de virions devido seu importante papel na interação entre a proteína de envelope viral E2 com Apolipoproteína E e trafego celular²⁷⁹, sendo a Anexina A3 é um importante fator do hospedeiro envolvido na liberação de partículas virais. Não apenas em HCV, anexina A3 pode também ter relevante papel na liberação de partículas virais por neutrófilos infectados com ZIKV, uma vez que esta proteína foi positivamente regulada em neutrófilos de placenta infectados com ZIKV.

Vale ressaltar que, embora nossa análise de proteômica tenha resultado em baixa cobertura de proteínas, apenas 6% destas foram alteradas significativamente, enquanto

que os outros 94% encontraram-se inalteradas. Com isso, podemos sugerir que embora os neutrófilos da placenta expressem marcadores como MHC-I e II, CD80 e 86, estas células de fato, não apresentam grandes alterações em perfil proteico, corroborando nossa ideia de que os neutrófilos são células-alvo para a replicação e disseminação viral.

Pareamos nossos dados de proteômica de neutrófilos da placenta com os de RNAseq de células CD45⁺ de placenta humana e encontramos 18 genes e proteínas concordantes. Dentre eles, destacamos os genes relacionados com função de neutrófilos, como Camp e Lcn2 que estão regulados negativamente em ambos os data sets.

Lcn2, ou Lipocalina 2, é um dos componentes dos grânulos secundários dos neutrófilos, é comumente expressa durante infecções bacterianas e promove sequestro de ferro necessário para o crescimento bacteriano²⁸⁰. Lcn2 é expressa no sistema nervoso central durante encefalite causada pela infecção por WNV, embora pouco se saiba sobre a função desta proteína neste cenário, parece que esta possui função antiviral ou imunoreguladora²⁸¹. Pacientes infectados com HIV antes de iniciarem tratamento antirretroviral apresentam baixos níveis de Lcn2, enquanto que durante o tratamento, os níveis desta proteína aumentam gradativamente. Além disso, foi detectada positiva correlação entre número de neutrófilos e níveis de Lcn2 durante o tratamento antirretroviral²⁸².

Camp, ou Catelicidinas, possuem ações antimicrobianas contra vários microrganismos, como bactérias gram-positivas e negativas, vírus envelopados e fungos²⁸³. Em infecções como IVA, HIV e RSV, catelicidinas tem sido envolvidas na redução da severidade da doença e replicação e disseminação viral e morte celular²⁸⁴⁻²⁸⁶. E, portanto, a redução da expressão de lipocalina e catelicidinas nos neutrófilos de placenta infectadas com ZIKV vai ao encontro da nossa hipótese de que estas células seriam alvos para a replicação viral.

S100A9, também conhecido como MRP9, é uma alarmina sensor de cálcio expresso constitutivamente em neutrófilos e monócitos e participa no rearranjo do citoesqueleto e metabolismos de ácido araquidônico²⁸⁷. Durante processos inflamatórios, esta alarmina é liberada pro meio extracelular e exerce importante papel no recrutamento de leucócitos e indução de citocinas²⁸⁷. Em infecção causada pelo HIV, os altos níveis de S100A8/A9 foram correlacionados com a progressão da doença e baixa contagem de células T CD4⁺²⁸⁸. Adicionalmente, S100A8/A9 é altamente expressa durante a infecção

por Sarsc-CoV2, e a inibição desta alarmina reverte sinais da doença e reduz a carga viral de animais infectados, a partir da redução da ativação exacerbada de neutrófilos e aumento de respostas anti-virais²⁸⁹. S100A9 possui capacidade de induzir a ativação de neutrófilos e, também, a liberação de NETs²⁹⁰. Neste contexto, podemos relacionar a baixa expressão de S100A9 com a não liberação de NETs pelos neutrófilos infectados da placenta, enquanto que mais dados são necessários para a correlação entre a replicação do ZIKV em neutrófilos e expressão desta alarmina.

Prdx5, ou Peroxiredoxina 5, compõe a família de peroxiredoxinas, que são enzimas antioxidantes que catalisam a produção de peróxido a fim de se manter os níveis celulares de peróxido de hidrogênio intracelular²⁹¹. Prdx5 é localizada nas mitocôndrias, peroxissomos e citoplasma celular^{292,293}. Peroxiredoxinas podem apresentar efeitos tanto antivirais, como em infecções por HIV e HBV, como pró-virais, em infecções por RSV e vírus do sarampo, como revisado por Karpenko e colaboradores, 2021²⁹⁴. Infecções por flavivírus geralmente induzem o aumento da expressão de peroxiredoxinas, como DENV o aumento de Prdx1 e HCV o aumento de Prdx4²⁹⁴. Enquanto que nenhuma alteração na expressão de Prdx2 foi detectada infecção por ZIKV e outras peroxiredoxinas não foram avaliadas²⁷⁵. Aqui, mostramos que em neutrófilos da placenta, a infecção por ZIKV induz tendência a baixa expressão de Prdx5.

Até aqui, discutimos os possíveis papéis das molecular reguladas negativamente na comparação entre os dados de RNAseq de placenta humana com os nossos dados de proteômica de neutrófilos de placentas. Embora 6 genes / proteínas tenham aparecido como reguladas positivamente nesta análise, gostaríamos de chamar a atenção para a molécula CD177.

CD177, também conhecido como NB1 ou PRV-1²⁹⁵, é uma proteína glicosilfosfatidilinositol ancorada a membrana de neutrófilos que está associada com transmigração de neutrófilos a partir de sua interação com a molécula PECAM-1²⁹⁶. Foi primeiramente descrita em estudos sobre neutropenia aloimune neonatal²⁹⁷, e também está associada com a Lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão e rejeição de enxertos²⁹⁸. Tem sido descrito o aumento da expressão desta molécula em alguns cenários como durante a gestação²⁹⁹ e infecções. A expressão de CD177 foi relacionado a ativação dos neutrófilos e severidade de doença e mortalidade de pacientes infectados com IVA³⁰⁰, RSV e Sars-CoV2³⁰¹, além disso, a expressão de CD177 também foi detectada em

neutrófilos imaturos durante infecção por Ebola³⁰². A piora no quadro das infecções acima citadas deve-se a ativação de neutrófilos e adicionalmente o aumento da expressão de CD177. Aqui, mostramos que ambos os data sets apresentam razoável aumento na expressão desta molécula, entretanto, outras moléculas relacionadas com via de ativação dos neutrófilos também estão reduzidas no RNAseq. Entretanto, mais experimentos são necessários para futuras conclusões a cerca da expressão de CD177 na infecção por ZIKV.

Até aqui, nossos achados sobre a relevância dos neutrófilos na infecção pelo ZIKV vai ao encontro do recente publicado por Kallas e colaboradores (2019), que mostraram que a alta contagem de neutrófilos no sangue de pacientes infectados com o vírus da febre amarela (YFV) pode ser utilizado com um preditor de mortalidade. Pacientes que apresentaram contagem de neutrófilos igual ou maior do que 4000 células por mL de sangue e carga viral acima de $5.1 \log_{10}/\text{mL}$ apresentaram 100% de taxa de mortalidade³⁰³.

É sabido que infecções virais podem induzir a produção de IL-8 (CXCL8), citocina pivô no recrutamento de neutrófilos e também envolvida na inibição da ação antiviral de IFN tipo I³⁰⁴⁻³⁰⁶. IL-8 exerce várias funções, como quimiotaxia de neutrófilos, basófilos e células T, indução do estresse oxidativo, e liberação de enzimas lisossomais³⁰⁷. Além disso, IL-8 diminui a habilidade do IFN em inibir a síntese de proteínas virais e, portanto, aumentando a replicação viral³⁰⁴. Adicionalmente, foi demonstrado que mulheres grávidas com sintomas da infecção por ZIKV e alta carga viral, também apresentavam altos níveis plasmáticos de CXCL8³⁰⁸. Aqui, mostramos que indivíduos infectados com ZIKV ou CHIK apresentam aumento dos níveis de IL-8 no soro comparados a indivíduos saudáveis. Entretanto, em comparação aos pacientes infectados com CHIK, os infectados com ZIKV apresentam ao menos 8 vezes mais IL-8. Portanto, podemos concluir que na infecção por ZIKV, a elevada produção de IL-8 possa acarretar massivo recrutamento de neutrófilos, propiciando ambiente abundante de células-alvo para a replicação celular, além de inibição de IFN.

Foi demonstrado em infecções por IAV que o influxo de neutrófilos para o pulmão influencia no recrutamento de células T CD8⁺ antivirais^{309,310}. Adicionalmente, neutrófilos infectados por IAV agem como células apresentadoras de antígenos no pulmão e induzem a ativação da resposta antiviral de células T CD8⁺²⁴¹. Em outros

modelos, foi mostrado que neutrófilos carregam antígenos virais da derme para a medula óssea, gerando células T CD8⁺ primada antígeno específicas na medula. Além disso, estas células parecem possuir diferentes funções efetoras e expressão gênica daquelas primadas nos linfonodos³¹¹.

Entretanto, tem sido descrito que neutrófilos também podem suprimir respostas de células T e assim, reduzindo a patologia causada pela infecção por IAV³¹². Estes neutrófilos maduros ou imaturos com capacidade de suprimir respostas imunes mediadas por células T são conhecidos como células supressoras derivadas de granulócitos milóides³¹³. No entanto, sabe-se que células T em estágios iniciais de ativação são susceptíveis a supressão pelos neutrófilos, enquanto que, células T em estágios finais não são³¹⁴. Aqui, mostramos que *in vitro*, neutrófilos infectados por ZIKV inibe a proliferação de células T CD8⁺. Porém, mais experimentos são necessários para compreender essa interface entre neutrófilos e células T CD8⁺ em infecção por ZIKV.

Células T CD8⁺ citotóxicas possuem papel protetor em infecções contra flavivírus, como DENV e WNV^{170,315} e, embora, alguns trabalhos tenham identificado os possíveis peptídeos do ZIKV que são reconhecidos por células T CD8⁺¹⁰⁸ e possível reatividade cruzada entre DENV e ZIKV³¹⁶ estes trabalhos foram todos realizados utilizando ZIKV de diferentes isolados, como a MR766 (Uganda, 1947) e FSS13025 (Cambodia, 2010). Até o momento, nenhum trabalho mostrou a relevância das células T CD8⁺ com isolado brasileiro, tampouco o papel das T CD8⁺ reguladoras neste contexto.

Aqui mostramos que animais C57BL/6 (resistentes) deficientes de células T CD8⁺ não sucumbem à infecção pelo ZIKV isolado brasileiro. Além disso, o pico da carga viral no soro e no baço destes animais foi no primeiro dia após a infecção, o que corrobora com dados de trabalhos já publicados com outras cepas^{7,107,108}. Curiosamente, observamos resultados opostos na quantificação de carga viral nestes dois órgãos de animais deficientes de T CD8⁺. Este resultado vai de encontro com os resultados publicados por Ngono e colaboradores (2017)¹⁰⁷ em que o número de partículas virais foi maior em todos os órgãos analisados de animais deficientes de células CD8⁺. As diferenças entre o trabalho de Ngono e aqui presente se resumem ao isolado viral, em que utilizaram MR766 e FSS13025 e, principalmente, o bloqueio da resposta imune inata pela utilização de anticorpos anti-IFNAR ou animais deficientes de IFN tipo I. Embora o uso de metodologias afim de se promover o bloqueio de IFN- α/β sejam um tanto questionáveis,

uma vez que fogem ao que ocorre naturalmente, os trabalhos que lançaram mão destas abordagens contribuíram para uma melhor compreensão dos mecanismos utilizados pelo ZIKV, principalmente no desenvolvimento de lesões no sistema nervoso central.

Análise de PCRArray para genes relacionados a imunidade inata e adaptativa nos apresentou variação de genes de imunidade antiviral e respostas de células T. Dentre eles, destacamos o *FasL*. Sabe-se que as interações entre Fas, em células alvo infectadas, e FasL, em células T CTL e células NK, levam à citólise da célula infectada através da ativação do domínio de morte intracelular das células-alvo seguido da ativação da cascata de caspases da via de apoptose^{160,161,165}. Defeitos nesta via afeta negativamente o controle da replicação viral de vários vírus, como por exemplo, WNV e hepatite murina^{168,170,171}. Em nosso modelo, células como NK e T CD4⁺ poderiam aumentar a expressão de FasL como mecanismo de compensação na ausência de células T CD8⁺. Entretanto, vale ressaltar que esse aumento de *FasL* ocorre 1 dia após a infecção, e, portanto, provavelmente são as células NK as que apresentam esse aumento em *FasL*, porém mais resultados são necessários para a confirmação desta suposição.

Outros genes que são positivamente regulados na ausência de células T CD8⁺ e infectados por ZIKV são o *Tlr-3* e *Irf3*. Estes genes codificam o “Toll like-receptor 3” (TLR3) e o “Interferon regulatory factor 3” (IRF3), respectivamente. Ambos estão intimamente relacionados à sinalização a partir do reconhecimento viral. TLR-3 é encontrado ancorado a membrana de compartimentos intracelulares^{317,318} e reconhece RNA de dupla fita (dsRNA)³¹⁹ de vírus que estão em ciclo de replicação ou que dsRNA faz parte do RNA genômico. A via de sinalização de TLR3 culmina na ativação de IRF3 e NFκB dependentes da ativação de TRIF^{318,320-322}. IRF3 está envolvido com a indução de IFN-β e IFN-α. Estes IFNs ao se ligarem ao receptor de interferon na membrana plasmática ativam um complexo conhecido como ISGF3, que consiste dos fatores transcricionais STAT1, STAT2 e IRF9, estimulando, portanto, a expressão de genes induzidos por IFN (ISGs) e IRF7³²³.

Além do aumento da expressão de *Tlr3* e *Irf3*, foi possível observar que outros dois genes que estão relacionados a esta via também estão positivamente regulados. Estes genes são o *Nfkb1* e o *Nfkbia*, que codificam NFκB subunidade p105, precursora da p50, e IκBα, respectivamente. *Nfkb1* possui importante função de regular a atividade de

NFκB^{324,325}, enquanto que *Nfkb1a* é o regulador negativo de NFκB de maior importância³²⁵.

Estes resultados mostram que embora a sinalização de *Tlr3* esteja positivamente regulada e culminando no aumento da expressão de *Irf3* e *Nfkb1*, um mecanismo de regulação/inibição de NFκB também está regulado positivamente como é o caso do *Nfkb1a*, e como consequência, observa-se a diminuição da expressão de *Tnf*, gene este que é dependente do fator de transcrição NFκB. Além disso, *Nod2* e *Tlr5* também estão em menor expressão. NOD são proteínas citosólicas reguladoras da apoptose e resistência a patógenos^{326,327}, enquanto que *Tlr5*, reconhece flagelina presente em bactérias e ativa NFκB³²⁸.

Outros genes negativamente regulados são os das citocinas *Il-17a*, *Il-1α* e *Il-1β*, todas estas, também, sob sinalização via NFκB. Entretanto, embora a expressão de *Il-17a* esteja reduzida no baço com 1 dia de infecção, a quantificação da citocina IL-17A não apresentou grandes alterações entre animais C57BL/6 e deficientes de CD8 durante a infecção. Além disso, pode se observar que os resultados se apresentam, em alguns momentos, de forma contraditória, como quando se avalia o *Mx1*, um ISG que está positivamente regulado, o *Ifn-α2* e *Tyk2*, membro da família JAK necessária para a função de IFN tipo I³²⁹, que estão negativamente regulados.

Por último, porém não menos importante, *H2-Q10*, um MHC-classe I (MHC-Ib), também possui baixa expressão neste trabalho, podendo ser este resultado dependente de mecanismo de evasão viral uma vez que, MHC-I pode ser reconhecido por células NK e, então estas responder contra infecções virais³³⁰. Toda essa variação na expressão de genes relacionados a reconhecimento de patógenos e resistência do hospedeiro mostra que na ausência de células T CD8⁺ os mecanismos de regulação da resposta imune e de evasão viral estão alterados.

Embora não se tenha observado grandes alterações na quantificação de citocinas no baço dos animais infectados, quando se avaliou as presentes no soro, pudemos observar redução de IFN-γ e, surpreendentemente, de IL-10. Células T CD8⁺ são grandes produtoras de IFN-γ^{163,164}, portanto não é de se estranhar que animais deficientes de células T CD8⁺ apresentem redução nos níveis desta citocina em modelos de infecção. Entretanto, a diminuição da IL-10 foi algo intrigante em nosso modelo. Esse fato nos levou a questionar a presença das células T CD8⁺ reguladoras durante a infecção por

ZIKV, e talvez a indução destas células em animais selvagens sejam as responsáveis pela diferença em carga viral.

As células $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ são induzidas durante fase iniciais da infecção pelo SIV, e a presença destas células é intimamente relacionada com a alta carga viral, e diminuição da ativação e proliferação de células T $CD4^+$, o que leva ao estabelecimento da infecção crônica²⁰⁸. De fato, detectamos o aumento da população de células T $CD8^+$ reguladoras já no primeiro dia de infecção e esse aumento é mantido até mesmo após a eliminação viral. Embora seja possível observar o aumento destas células reguladoras, estas parecem não serem suficientes para o comprometimento das respostas de células CTL e de IFN tipo I, visto que animais C57BL/6 conseguem controlar a infecção por ZIKV. Embora existam artigos sobre o papel das células T $CD8^+Foxp3^+$ em infecções virais, ainda pouco se sabe sobre a indução de células T $CD8^+$ reguladoras e, muito menos sua importância em infecções por flavivírus, aqui, portanto, demonstramos possíveis funções destas células na infecção por ZIKV cepa brasileira.

Células T $CD8^+$ reguladoras compreende algumas populações celulares que podem expressar ou não Foxp3 e com características de suprimir a resposta imune, seja ela em infecções virais ou doenças autoimunes^{209,331-333}. É descrito que células T $CD8^+Foxp3^+$ compreende cerca de 0.4 e 0.1% de células T no sangue de indivíduos saudáveis e de camundongos³³⁴. T $CD8^+$ reg são responsáveis por inibir respostas de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ através de diferentes mecanismos, dependente de contato ou por fatores solúveis, como expressão de galectina-1 e liberação de granzimas³³⁵, pela produção de IL-10¹⁹⁶, TGF β - e IFN γ ³³⁶ e expressão de FasL^{337,338} e perforina¹⁹². Interessantemente, em nosso modelo, células T $CD8^+Foxp3^+$ após a infecção por ZIKV expressam altos níveis de FasL.

Células T $CD8^+Foxp3^+$ proliferam em resposta a IL-2 produzida pelas células B presentes no baço³³², e a sinalização através IL-2Ra – STAT5 tanto em células $CD4^+$, quanto em células $CD8^+$ reguladoras é essencial para a expressão de Helios. A deleção específica desse fator de transcrição em células T $CD8^+$ resulta no aparecimento de doenças autoimunes, confirmando essencial contribuição das células $CD8^+$ reg na supressão de resposta a antígenos próprios³³⁹. TGF β ^{340,341} e o Fator de transcrição Eomes também são pivôs no controle da identidade reguladora e homeostasia das células T

CD8⁺reg³⁴⁰. Experimentos *in vitro* mostraram que o efeito destas células em suprimir proliferação celular é igual ou até mesmo maior do que células T CD4⁺ regs³³⁴.

Células T CD8⁺Foxp3⁺ expressam altos níveis de CTLA-4, ICOS e Ki-67 em comparação as células CD8 CTL^{196,334,336,342}, e baixa expressão de CD127, receptor da IL-7³³⁴. Em nosso modelo, vimos que tanto as células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais controles, quanto as induzidas por ZIKV possuem baixos níveis de expressão de CTLA-4 e CD127 comparados às células CD8 totais, o que vai de encontro com os trabalhos previamente apresentados. Entretanto, quando comparamos a expressão destes marcadores entre células T CD8⁺Foxp3⁺ e T CD4⁺Foxp3⁺, vimos que as T CD8⁺Foxp3⁺ expressão mais CTLA-4 e CD127 independente da infecção.

Embora saibamos que IL-2 pode induzir a proliferação de células T CD8⁺Foxp3⁺, aqui mostramos que esta citocina não está aumentada após a infecção, e portanto, algum outro mecanismos pode estar envolvido na indução destas células. É descrito que a IL-33, uma alarmina liberada após lesão celular, é importante na indução e manutenção de células T CD4⁺Foxp3⁺ através da sinalização de GATA-3 e STAT5 (como revisado em ²⁴²), e promoção de células com funções reguladoras no intestino³⁴³. No cenário de células T CD8⁺, a IL-33 é necessária para potente respostas de células CTL contra vírus de RNA e DNA³⁴⁴ e tumores^{345,346}.

Entretanto, até o momento, não tem nada na literatura sobre o papel desta citocina em células T CD8⁺Foxp3⁺. Aqui, mostramos que a expressão de IL-33 é aumentada durante vírus os 3 primeiros dias de infecção pelo ZIKV. Aqui, dentre os diversos marcadores analisados, avaliamos a expressão de ST2, o receptor de IL-33, porém não foi possível detectar nenhuma diferença na expressão desse receptor independente da infecção por ZIKV. Entretanto, vale ressaltar que a análise do fenótipo destas células foi realizada após 15 a infecção, período em que não tem mais expressão de IL-33 no baço, portanto, seria difícil sugerir a relação IL-33 e ST2 na indução das células T CD8⁺Foxp3⁺ em nosso modelo de infecção.

Aqui, realizamos a análise do fenótipo das células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais controles e as induzidas por ZIKV utilizando a ferramenta de tSNE do software de análise de citometria FlowJo e vimos que a infecção por ZIKV induz o surgimento de 5 diferentes populações de células T CD8⁺Foxp3⁺ e todas estas populações expressam Ly6C, pertencente à família de moléculas GPI ancoradas a membrana. Ly6C é expresso em

células T CD4⁺ efetoras de vida curta³⁴⁷ e expresso em células T CD8⁺ de memória central e é relacionado com o processo de migração destas células para os linfonodos³⁴⁸. No contexto de células CD4⁺Treg, a expressão de Ly6C está relacionado com menor ativação celular, proliferação e diferenciação, bem como menor capacidade funcional. Além disso, foi demonstrado que os níveis de expressão de Ly6C é dependente da sinalização via TCR-antígenos próprios³⁴⁹.

Além disso, pudemos notar a expressão de marcadores relacionados a memória e migração celular, como CD62L e CXCR3 que até então tinham sido descritos apenas em células T CD8⁺reg humanas³⁵⁰. Contudo, resumidamente, a grande diferença entre células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais ZIKV e controles é a expressão de FasL e Ly6C.

Aqui, além de caracterizarmos o fenótipo das células T CD8⁺Foxp3⁺, avaliamos se tanto as células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais controles, quanto de animais infectados por ZIKV seriam capazes de interferir na replicação viral e consequentemente carga viral dos animais infectados. Para responder esta questão, realizamos transferência adotiva de células T CD8⁺Foxp3⁺ para animais deficientes de células T CD8. No dia seguinte, desafiamos estes animais com ZIKV e 24 horas após avaliamos a carga viral no soro e baço. Interessantemente, vimos diferença na carga viral dos animais transferidos com células provenientes de animais controles comparados àqueles que receberam células de animais previamente infectados.

A transferência de células T CD8⁺Foxp3⁺ de animais controles foram relacionadas com maior viremia, enquanto que as T CD8⁺Foxp3⁺ de animais infectados, não apresentaram diferença em comparação à viremia de animais deficientes de células T CD8⁺. Embora tenhamos caracterizado alguns marcadores das células T CD8⁺Foxp3⁺ ainda não sabemos sobre as características moleculares, citocinas que elas produzem e até mesmo se são células em exaustão ou não, portanto, mais experimentos são necessários para melhor caracterização funcional das células T CD8⁺Foxp3⁺ no modelo de infecção por ZIKV.

Nosso trabalho abre diferentes perspectivas no cenário da infecção por ZIKV e resposta imune inata e adaptativa. Em resumo, nossos resultados apontam para importância de células T CD8⁺ reguladoras e dos neutrófilos no contexto da infecção por ZIKV, e extrapolamos a possível associação dos neutrófilos à síndrome congênita. Neste contexto, apostamos no possível papel dos neutrófilos como “*trojan horses*” viral na

placenta e assim, auxiliando na transmissão vertical. Nosso trabalho traz resultados interessantes e promissores na busca da imunopatogênese da infecção pelo ZIKV.

CONCLUSÃO

- ZIKV possui a capacidade de infectar neutrófilos de camundongos resistentes e susceptíveis, sem alterar a produção de ERO e meia-vida destas células;
- ZIKV infecta neutrófilos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, sem induzir produção de ERO, tampouco liberação de NETs;
- Neutrófilos infectados por ZIKV não apresentam aumento da expressão de IFNAR e, portanto, parecem não ser dependentes de sinalização de IFN tipo I;
- Neutrófilos infectados podem ser detectados no sangue e na placenta de animais infectados *in vivo*;
- Neutrófilos infectados de placenta apresentam moderada a baixa alteração no perfil de proteínas como mostrado por proteômica;
- Transferência de neutrófilos infectados *in vitro* é suficiente para disseminação viral;
- Indivíduos infectados com ZIKV produzem maiores níveis de IL-8 comparados aos infectados com CHIKV;⁹
- A ausência de células T CD8⁺ altera o perfil de expressão gênica no baço dos animais infectado por ZIKV, porém sem mudar o perfil de resistência a infecção;
- Infecção por ZIKV induz a produção de citocinas inflamatórias no baço e soro de animais após a infecção;
- Infecção por ZIKV induz o aumento da população de células T CD8⁺Foxp3⁺;
- T CD8⁺Foxp3⁺ de animais infectados com ZIKV expressa altos níveis de FasL e Ly6C, moléculas estas que podem estar relacionadas com o déficit de função destas células;
- T CD8⁺Foxp3⁺ de animais naïve parecem proporcionar ambiente favorável para a replicação do ZIKV;

REFERÊNCIAS

1. S, M., RJ, K. & MG, R. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 13–22 (2005).
2. G, K., GJ, C., KR, T., N, K. & CB, C. Phylogeny of the genus Flavivirus. *J. Virol.* **72**, 73–83 (1998).
3. J, M. *et al.* T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J. Immunol.* **176**, 3821–3829 (2006).
4. M, B. *et al.* Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res.* **87**, 125–148 (2010).
5. R, H. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* **89**, 8880–8896 (2015).
6. P, A. *et al.* Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science* **353**, 1129–1132 (2016).
7. RA, L. *et al.* Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature* **536**, 474–478 (2016).
8. BD, L. Virion assembly and release. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **369**, 199–218 (2013).
9. BD, L. & CM, R. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J. Virol.* **71**, 9608–9617 (1997).
10. Muylaert, I. R., Galler, R. & Rice, C. M. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J. Virol.* **71**, 291 (1997).
11. Leung, J. Y. *et al.* Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *J. Virol.* **82**, 4731–4741 (2008).
12. BM, K. & CM, R. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J. Virol.* **76**, 4773–4784 (2002).
13. CF, A., F, P. & JH, S. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology* **193**, 888–899 (1993).
14. Chambers, T. J., Nestorowicz, A., Amberg, S. M. & Rice, C. M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J. Virol.* **67**, 6797 (1993).
15. Chambers, T. J., Grakoui, A. & Rice, C. M. Processing of the yellow fever virus nonstructural polyprotein: a catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. *J. Virol.* **65**, 6042 (1991).
16. H, L., S, C., S, Y., KE, E. & R, P. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J. Virol.* **73**, 3108–3116 (1999).
17. P, W., JK, T. & MS, C. RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. *J. Virol.* **67**, 989–996 (1993).
18. G, W. & G, W. The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. *Virology* **184**, 707–715 (1991).
19. S, M., S, K., J, K.-L., S, B. & R, B. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J. Biol. Chem.* **282**, 8873–8882 (2007).
20. J, R., EG, W., A, K. & JM, M. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-

- 2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. *J. Virol.* **80**, 4623–4632 (2006).
21. D, G. *et al.* A single amino acid in nonstructural protein NS4B confers virulence to dengue virus in AG129 mice through enhancement of viral RNA synthesis. *J. Virol.* **85**, 7775–7787 (2011).
 22. JL, M.-J. *et al.* Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J. Virol.* **79**, 8004–8013 (2005).
 23. I, U., A, C., A, S., F, G. & SG, V. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J. Gen. Virol.* **87**, 2605–2614 (2006).
 24. M, A. & R, P. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *J. Biol. Chem.* **276**, 39926–39937 (2001).
 25. KJ, G., EG, W. & AA, K. Expression and purification of enzymatically active recombinant RNA-dependent RNA polymerase (NS5) of the flavivirus Kunjin. *J. Virol. Methods* **92**, 37–44 (2001).
 26. J, A., M, L.-R., PY, S. & A, G.-S. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J. Virol.* **83**, 5408–5418 (2009).
 27. SM, B. *et al.* Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J. Virol.* **79**, 12828–12839 (2005).
 28. S, D. *et al.* 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* **468**, 452–456 (2010).
 29. JT, G., J, H. & C, S. West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon. *J. Virol.* **79**, 1343–1350 (2005).
 30. JL, M.-J., GG, S.-B., M, L.-R. & A, G.-S. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14333–14338 (2003).
 31. GW, D., SF, K. & AJ, H. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509–520 (1952).
 32. VM, C.-L. & D, M. Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet (London, England)* **384**, 1571–1572 (2014).
 33. Zanoluca, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 569–572 (2015).
 34. NR, F. *et al.* Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature* **546**, 406–410 (2017).
 35. D, M. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1887–1889 (2015).
 36. AJ, R.-M. Zika: the new arbovirus threat for Latin America. *J. Infect. Dev. Ctries.* **9**, 684–685 (2015).
 37. Haddow, A. D. *et al.* Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1477 (2012).
 38. MR, D. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2536–2543 (2009).
 39. AS, O. M. *et al.* Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **47**, 6–7 (2016).
 40. D, M. *et al.* Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 359–361 (2015).
 41. SL, H. *et al.* Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 215–216 (2016).

42. J, G. *et al.* Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature* **540**, 438–442 (2016).
43. Sheng, Z.-Y. *et al.* Sertoli Cells Are Susceptible to ZIKV Infection in Mouse Testis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **0**, 272 (2017).
44. Kumar, A. *et al.* Human Sertoli cells support high levels of Zika virus replication and persistence. *Sci. Reports 2018 81* **8**, 1–11 (2018).
45. JM, T. *et al.* Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. *Lancet (London, England)* **387**, 2501 (2016).
46. E, D. *et al.* Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* **374**, 2195–2198 (2016).
47. Tang, W. W. *et al.* A Mouse Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral Replication. *Cell Rep.* **17**, 3091–3098 (2016).
48. J, M. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **374**, 951–958 (2016).
49. P, B. *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2321–2334 (2016).
50. Ventura, C. V., Maia, M., Dias, N., Ventura, L. O. & Belfort, R. Zika: Neurological and ocular findings in infant without microcephaly. *Lancet* **387**, 2502 (2016).
51. S, S., R, S., J, L., KE, H. & MR, C. Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1907–1909 (2016).
52. Faye, O. *et al.* Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2636 (2014).
53. Haddow, A. J., Williams, M. C., Woodall, J. P., Simpson, D. I. H. & Goma, L. K. H. Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bull. World Health Organ.* **31**, 57 (1964).
54. AW, M. & BG, K. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**, 552–562 (1982).
55. A, E., J, C., J, R., M, K. & D, R. Zika virus genome from the Americas. *Lancet (London, England)* **387**, 227–228 (2016).
56. G, C. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet. Infect. Dis.* **16**, 653–660 (2016).
57. GS, C., AC, B. & SI, S. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1885–1886 (2015).
58. VM, C.-L. *et al.* Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1085–1086 (2014).
59. Ministério da Saude, B. Boletim Epidemiológico. *Ministério da Saúde, Bras.* **49**, (2018).
60. Ministério da Saude, B. Boletim epidemiológico. *Ministério da Saúde, Brasil* https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/15/boletim_epidemiologico_svs_8.pdf (2021).
61. Polonio, C. M., Freitas, C. L. de, Zanluqui, N. G. & Peron, J. P. S. Zika virus congenital syndrome: experimental models and clinical aspects. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **23**, (2017).
62. JJ, M. *et al.* Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell* **165**, 1081–1091 (2016).
63. C, L. *et al.* Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* **19**, 120–126 (2016).
64. Cugola, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* **534**, 267–271 (2016).

65. TM, B., EJ, F. & HK, N. Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **35**, 183–193 (1971).
66. Meertens, L. *et al.* The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe* **12**, 544 (2012).
67. GV, F. *et al.* Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet (London, England)* **388**, 891–897 (2016).
68. MA, J., L, M.-T.-R., J, R., SM, G. & SL, H. Zika and the Risk of Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1–4 (2016).
69. H, W. *et al.* First-trimester intrauterine Zika virus infection and brain pathology: prenatal and postnatal neuroimaging findings. *Prenat. Diagn.* **36**, 785–789 (2016).
70. EL, M. *et al.* Differential Responses of Human Fetal Brain Neural Stem Cells to Zika Virus Infection. *Stem cell reports* **8**, 715–727 (2017).
71. Caires-Júnior, L. C. *et al.* Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. *Nat. Commun.* **2018 91 9**, 1–11 (2018).
72. A, N., K, D., B, H. & A, B. Role of pattern recognition receptors in flavivirus infections. *Virus Res.* **185**, 32–40 (2014).
73. Kawai, T. & Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* **2006 72 7**, 131–137 (2006).
74. K, S. & J, T. The inflammasomes. *Cell* **140**, 821–832 (2010).
75. DB, S. & R, M. Type I interferons in host defense. *Immunity* **25**, 373–381 (2006).
76. O, T. & S, A. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
77. HW, C. *et al.* The roles of IRF-3 and IRF-7 in innate antiviral immunity against dengue virus. *J. Immunol.* **191**, 4194–4201 (2013).
78. I, U. *et al.* Dengue virus regulates type I interferon signalling in a strain-dependent manner in human cell lines. *J. Gen. Virol.* **89**, 3052–3062 (2008).
79. JL, M.-J. Subversion of interferon by dengue virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **338**, 35–44 (2010).
80. AM, N. *et al.* RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, (2011).
81. A, B. *et al.* Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* **19**, 705–712 (2016).
82. E, N.-S., P, D. & L, C.-B. Innate immune responses to dengue virus. *Arch. Med. Res.* **36**, 425–435 (2005).
83. JD, M. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 367–382 (2012).
84. GA, V. & A, G.-S. Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 508–516 (2010).
85. A, G. *et al.* Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe* **19**, 882–890 (2016).
86. A, K. *et al.* Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep.* **17**, 1766–1775 (2016).
87. Chaudhary, V. *et al.* Selective Activation of Type II Interferon Signaling by Zika Virus NS5 Protein. *J. Virol.* **91**, (2017).
88. SP, S., RE, T., EI, van der V., R, O. & CJ, M. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**, 480–483 (1998).

89. MJ, B. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 595–602 (2004).
90. Y, N., B, L., C, G. & A, I. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature* **462**, 510–513 (2009).
91. C, B., B, R. & C, T. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* **297**, 2060–2063 (2002).
92. EM, S. & MS, D. CD4+ T-cell responses are required for clearance of West Nile virus from the central nervous system. *J. Virol.* **80**, 12060–12069 (2006).
93. Sitati, E., McCandless, E. E., Klein, R. S. & Diamond, M. S. CD40-CD40 Ligand Interactions Promote Trafficking of CD8+ T Cells into the Brain and Protection against West Nile Virus Encephalitis. *J. Virol.* **81**, 9801 (2007).
94. A, M. & AL, R. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol. Rev.* **225**, 300–313 (2008).
95. I, K. *et al.* Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J. Clin. Invest.* **88**, 1473–1480 (1991).
96. S, G. *et al.* Early CD69 expression on peripheral blood lymphocytes from children with dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* **180**, 1429–1435 (1999).
97. J, M. *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat. Med.* **9**, 921–927 (2003).
98. Imrie, A. *et al.* Differential Functional Avidity of Dengue Virus-Specific T-Cell Clones for Variant Peptides Representing Heterologous and Previously Encountered Serotypes. *J. Virol.* **81**, 10081 (2007).
99. Livingston, P. G. *et al.* Dengue virus-specific, HLA-B35-restricted, human CD8+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones. Recognition of NS3 amino acids 500 to 508 by CTL clones of two different serotype specificities. *J. Immunol.* **154**, (1995).
100. Mathew, A. *et al.* Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a. *J. Clin. Invest.* **98**, 1684 (1996).
101. MM, M. & AL, R. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J. Immunol.* **175**, 2676–2683 (2005).
102. Littaua, R., Kurane, I. & Ennis, F. A. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J. Immunol.* **144**, (1990).
103. SC, K., S, N., A, N. & DS, B. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**, 411–419 (1988).
104. SC, K., A, N., WE, B., L, W. & DS, B. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**, 444–451 (1989).
105. SB, H. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J. Infect. Dis.* **140**, 527–533 (1979).
106. AP, G., RE, E., M, S. C., RH, P. & CJ, L. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 9422–9427 (2007).
107. Elong Ngono, A. *et al.* Mapping and Role of the CD8+ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. *Cell Host Microbe* **21**, 35–46 (2017).
108. Pardy, R. D. *et al.* Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. *PLoS Pathog.* **13**, 1–

- 26 (2017).
109. Huang, H. *et al.* CD8+ T Cell Immune Response in Immunocompetent Mice during Zika Virus Infection. *J. Virol.* **91**, 1–15 (2017).
 110. Wen, J. *et al.* Dengue virus-reactive CD8+ T cells mediate cross-protection against subsequent Zika virus challenge. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
 111. 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 Pathog.* **12**, 1–20 (2016).
 112. Jurado, K. A. *et al.* Antiviral CD8 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in mice. *Nat. Microbiol.* **3**, 141–147 (2018).
 113. NL, B., RS, G., T, S., J, W. & CA, B. Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host Microbe* **20**, 423–428 (2016).
 114. Broutet, N. *et al.* Zika Virus as a Cause of Neurologic Disorders. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1506–1509 (2016).
 115. JB, B. *et al.* Comparative Analysis Between Flaviviruses Reveals Specific Neural Stem Cell Tropism for Zika Virus in the Mouse Developing Neocortex. *EBioMedicine* **10**, 71–76 (2016).
 116. Q, L. *et al.* Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Dereulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* **19**, 663–671 (2016).
 117. Tiwari, S. K. *et al.* Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection. *Emerg. Microbes Infect.* **6**, e24 (2017).
 118. N, A., Y, S., TS, D. & CB, C. Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. *Cell Host Microbe* **21**, 561–567 (2017).
 119. AZ, R., W, Y., DA, H., CA, R. & DA, S. Placental Pathology of Zika Virus: Viral Infection of the Placenta Induces Villous Stromal Macrophage (Hofbauer Cell) Proliferation and Hyperplasia. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **141**, 43–48 (2017).
 120. Jurado, K. A. *et al.* Zika virus productively infects primary human placenta-specific macrophages. *JCI Insight* **1**, 88461 (2016).
 121. KM, Q. *et al.* Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* **20**, 83–90 (2016).
 122. Summers, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* **31**, 318 (2010).
 123. Johansson, C. & Kirsebom, F. C. M. Neutrophils in respiratory viral infections. *Mucosal Immunology* vol. 14 815–827 (2021).
 124. Casanova-Acebes, M. *et al.* Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissues. *J. Exp. Med.* **215**, 2778–2795 (2018).
 125. Pingen, M. *et al.* Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. *Immunity* **44**, 1455–1469 (2016).
 126. Williams, M., Azcutia, V., Newton, G., Alcaide, P. & Luscinskas, F. W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol.* **32**, 461 (2011).
 127. S, R., O, Ø., NH, H. & N, B. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 711–721 (2013).
 128. WC, W., ME, S. & SH, W. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* **3**, 1362–1373 (1994).

129. EM, K. *et al.* Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 10957–10970 (2012).
130. N, B. Development of neutrophil granule diversity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **832**, 62–68 (1997).
131. S, T. *et al.* The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins. *J. Gen. Virol.* **94**, 40–49 (2013).
132. Currie, S. M. *et al.* Cathelicidins Have Direct Antiviral Activity against Respiratory Syncytial Virus In Vitro and Protective Function In Vivo in Mice and Humans. *J. Immunol. Author Choice* **196**, 2699 (2016).
133. Emboriadou, M. *et al.* Human neutrophil elastase in RSV bronchiolitis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **37**, 79–84 (2007).
134. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology* vol. 18 134–147 (2018).
135. S, S. *et al.* Degradation of Japanese encephalitis virus by neutrophils. *Int. J. Exp. Pathol.* **80**, 17–24 (1999).
136. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80-)*. **303**, 1532–1535 (2004).
137. M, H. *et al.* Arginine-rich histones have strong antiviral activity for influenza A viruses. *Innate Immun.* **21**, 736–745 (2015).
138. Saitoh, T. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* **12**, 109–116 (2012).
139. B, C. *et al.* Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *J. Pathol.* **238**, 401–411 (2016).
140. NC, P. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* **321**, 970–974 (2008).
141. EB, E. *et al.* Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect. Immun.* **73**, 1744–1753 (2005).
142. Zhao, Y. *et al.* Neutrophils may be a vehicle for viral replication and dissemination in human h5n1 avian influenza. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 1575–1578 (2008).
143. Bai, F. *et al.* A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *J. Infect. Dis.* **202**, 1804–1812 (2010).
144. Giaglis, S. *et al.* Neutrophil migration into the placenta: Good, bad or deadly? *Cell Adhesion and Migration* vol. 10 208–225 (2016).
145. IV, N. & SV, S. Female sex steroid hormones in regulation of neutrophil enzymatic activity. *Dokl. Biochem. Biophys.* **453**, 312–315 (2013).
146. M, M. *et al.* Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J. Immunol.* **170**, 4665–4672 (2003).
147. M, S. & J, G. Epstein-Barr virus immunosuppression of innate immunity mediated by phagocytes. *Virus Res.* **119**, 134–145 (2006).
148. JE, G., KM, L., LP, M., JM, F. & KL, Y. Cytomegalovirus-infected endothelial cells recruit neutrophils by the secretion of C-X-C chemokines and transmit virus by direct neutrophil-endothelial cell contact and during neutrophil transendothelial migration. *J. Infect. Dis.* **177**, 1465–1474 (1998).
149. Milner, J. J. *et al.* Delineation of a molecularly distinct terminally differentiated memory CD8 T cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 25667–25678 (2020).
150. Weninger, W., Crowley, M. A., Manjunath, N. & Von Andrian, U. H. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **194**, 953–

- 966 (2001).
151. Campbell, J. J. *et al.* CCR7 Expression and Memory T Cell Diversity in Humans. *J. Immunol.* **166**, 877–884 (2001).
 152. Cose, S., Brammer, C., Khanna, K. M., Masopust, D. & Lefrançois, L. Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1423–1433 (2006).
 153. Kaech, S. M., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: Implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 251–262 (2002).
 154. Jameson, S. C. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nature Reviews Immunology* vol. 2 547–556 (2002).
 155. Kaech, S. M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 749–761 (2012).
 156. Kaech, S. M. *et al.* Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* **4**, 1191–1198 (2003).
 157. Joshi, N. S. *et al.* Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity* **27**, 281–295 (2007).
 158. Hickman, H. D. & Pierson, T. C. T Cells Take on Zika Virus. *Immunity* **46**, 13–14 (2017).
 159. JT, H. & VP, B. Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 360–365 (2002).
 160. JH, R. & TJ, L. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 323–370 (2002).
 161. S, S., CT, P., DA, T., TA, G. & TJ, L. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 581–587 (1998).
 162. JT, H., AR, T. & DW, W. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 275–308 (2000).
 163. A, M. *et al.* Antigen-dependent release of IFN-gamma by cytotoxic T cells up-regulates Fas on target cells and facilitates exocytosis-independent specific target cell lysis. *J. Immunol.* **169**, 145–150 (2002).
 164. M, R., M, L., RV, B. & A, M. Effector cytotoxic function but not IFN-gamma production in cytotoxic T cells triggered by virus-infected target cells in vitro. *Scand. J. Immunol.* **54**, 366–374 (2001).
 165. M, K., J, C., A, W. & M, N. Involvement of Fas and FasL in Ectromelia virus-induced apoptosis in mouse brain. *Virus Res.* **115**, 141–149 (2006).
 166. S, N. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355–365 (1997).
 167. D, K. *et al.* Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* **265**, 528–530 (1994).
 168. B, P. *et al.* Contributions of Fas-Fas ligand interactions to the pathogenesis of mouse hepatitis virus in the central nervous system. *J. Virol.* **74**, 2447–2450 (2000).
 169. CP, R., A, M., M, T., D, K. & M, B. Theiler's virus infection of perforin-deficient mice. *J. Virol.* **72**, 4515–4519 (1998).
 170. B, S. & MS, D. Role of CD8+ T cells in control of West Nile virus infection. *J. Virol.* **78**, 8312–8321 (2004).
 171. Y, W., M, L., E, L. & A, M. CD8+ T cells mediate recovery and immunopathology in West Nile virus encephalitis. *J. Virol.* **77**, 13323–13334 (2003).

172. B, S. & MS, D. Fas ligand interactions contribute to CD8+ T-cell-mediated control of West Nile virus infection in the central nervous system. *J. Virol.* **81**, 11749–11757 (2007).
173. JW, H., RL, W., S, S., JH, R. & TJ, L. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* **76**, 977–987 (1994).
174. J, L. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 361–370 (2003).
175. JA, T. & MJ, S. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 735–747 (2002).
176. JA, T. *et al.* Efficient nuclear targeting of granzyme B and the nuclear consequences of apoptosis induced by granzyme B and perforin are caspase-dependent, but cell death is caspase-independent. *J. Biol. Chem.* **273**, 27934–27938 (1998).
177. CJ, F. *et al.* New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**, 29073–29079 (1996).
178. CM, T. & GM, G. Delivering the kiss of death. *Nat. Immunol.* **4**, 399–403 (2003).
179. ME, P. *et al.* Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* **32**, 79–90 (2010).
180. EL, P. *et al.* Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* **302**, 1041–1043 (2003).
181. AM, I. *et al.* Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* **6**, 1236–1244 (2005).
182. C, K. *et al.* Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. *Nat. Immunol.* **12**, 663–671 (2011).
183. SJ, S. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655–669 (2000).
184. Verdeil, G., Puthier, D., Nguyen, C., Schmitt-Verhulst, A.-M. & Auphan-Anezin, N. STAT5-Mediated Signals Sustain a TCR-Initiated Gene Expression Program toward Differentiation of CD8 T Cell Effectors. *J. Immunol.* **176**, 4834–4842 (2006).
185. F, C.-G. *et al.* Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J. Exp. Med.* **206**, 51–59 (2009).
186. Vuddamalay, Y. *et al.* Mouse and human CD8 + CD28 low regulatory T lymphocytes differentiate in the thymus. *Immunology* **148**, 187–196 (2016).
187. L, S. *et al.* Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells and antigen specific CD4+CD25+ and CD8+CD28- T suppressor cells. *Hum. Immunol.* **65**, 1297–1306 (2004).
188. Cosmi, L. *et al.* Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* **102**, 4107–4114 (2003).
189. M, E. *et al.* HIV-specific IL-10-positive CD8+ T cells suppress cytolysis and IL-2 production by CD8+ T cells. *J. Immunol.* **178**, 3265–3271 (2007).
190. ME, M. *et al.* Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.* **66**, 13–20 (2005).
191. KH, M. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev.*

- Immunol.* **4**, 841–855 (2004).
192. Saligrama, N. *et al.* Opposing T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature* **572**, 481–487 (2019).
 193. Cantor, H. & Kim, H.-J. A new chapter in the CD8 T reg story. *J. Exp. Med.* **218**, (2020).
 194. Rifa'i, M., Kawamoto, Y., Nakashima, I. & Suzuki, H. Essential Roles of CD8 + CD122 + Regulatory T Cells in the Maintenance of T Cell Homeostasis. *J. Exp. Med.* **200**, 1123–1134 (2004).
 195. L, C. *et al.* Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25+ regulatory thymocytes because of their responsiveness to different cytokines. *Blood* **103**, 3117–3121 (2004).
 196. Xystrakis, E. *et al.* Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* **104**, 3294–3301 (2004).
 197. Filaci, G. *et al.* Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-Cell proliferation and CTL function. *Hum. Immunol.* **65**, 142–156 (2004).
 198. LB, J. *et al.* Autoreactive human peripheral blood CD8+ T cells with a regulatory phenotype and function. *Eur. J. Immunol.* **35**, 2896–2908 (2005).
 199. F, M. *et al.* Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD8+CD28- T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Hum. Immunol.* **67**, 1–12 (2006).
 200. Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J. A. & Herold, K. C. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *J. Clin. Invest.* **115**, 2904–2913 (2005).
 201. J, N. *et al.* HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* **108**, 3808–3817 (2006).
 202. Hoji, A., Coro, A., Ng, H. L., Jamieson, B. D. & Yang, O. O. Proliferation and Foxp3 Expression in Virus-Specific Memory CD8 + T Lymphocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **24**, 1087–1095 (2008).
 203. D, H. *et al.* Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat. Immunol.* **5**, 516–523 (2004).
 204. H, J. *et al.* T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+) T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4533–4537 (1998).
 205. G, V., R, C. & N, S.-F. CD8+ T suppressor cells and the ILT3 master switch. *Hum. Immunol.* **69**, 681–686 (2008).
 206. CC, C. *et al.* Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.* **3**, 237–243 (2002).
 207. Z, L., S, T., R, C. & N, S.-F. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int. Immunol.* **10**, 775–783 (1998).
 208. Karlsson, I. *et al.* FoxP3+ CD25+ CD8+ T-Cell Induction during Primary Simian Immunodeficiency Virus Infection in Cynomolgus Macaques Correlates with Low CD4+ T-Cell Activation and High Viral Load. *J. Virol.* **81**, 13444–13455 (2007).
 209. J, G. *et al.* Early short-term antiretroviral therapy is associated with a reduced prevalence of CD8(+)FoxP3(+) T cells in simian immunodeficiency virus-infected controller rhesus macaques. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **27**, 763–775 (2011).
 210. Wang, F. *et al.* Development of Virus-Specific CD4+ and CD8+ Regulatory T Cells Induced by Human Herpesvirus 6 Infection. *J. Virol.* **88**, 1011–1024 (2014).
 211. Billerbeck, E., Blum, H. E. & Thimme, R. Parallel Expansion of Human Virus-Specific FoxP3 – Effector Memory and De Novo-Generated FoxP3 + Regulatory

- CD8 + T Cells upon Antigen Recognition In Vitro. *J. Immunol.* **179**, 1039–1048 (2007).
212. DC, G., LF, L., SA, Q., S, S. & RJ, N. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* **174**, 1783–1786 (2005).
 213. WJ, G. *et al.* Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* **21**, 589–601 (2004).
 214. Bull, M. E. *et al.* HIV-1 shedding from the female genital tract is associated with increased Th1 cytokines/chemokines that maintain tissue homeostasis and proportions of CD8+FOXP3+ T cells. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **67**, 357–364 (2014).
 215. T, T., SA, S., DL, R. & FH, C. Decidual CD8+CD28- T cells express CD103 but not perforin. *Hum. Immunol.* **70**, 96–100 (2009).
 216. Tilburgs, T. *et al.* Differential Distribution of CD4+CD25bright and CD8+CD28- T-cells in Decidua and Maternal Blood During Human Pregnancy. *Placenta* **27**, 47–53 (2006).
 217. Shao, L., Jacobs, A. R., Johnson, V. V. & Mayer, L. Activation of CD8 + Regulatory T Cells by Human Placental Trophoblasts . *J. Immunol.* **174**, 7539–7547 (2005).
 218. Gomez-Lopez, N., Olson, D. M. & Robertson, S. A. Interleukin-6 controls uterine Th9 cells and CD8 + T regulatory cells to accelerate parturition in mice. *Immunol. Cell Biol.* **94**, 79–89 (2016).
 219. Baer, A. & Kehn-Hall, K. Viral concentration determination through plaque assays: Using traditional and novel overlay systems. *J. Vis. Exp.* (2014) doi:10.3791/52065.
 220. Hatanaka, E., Levada-Pires, A. C., Pithon-Curi, T. C. & Curi, R. Systematic study on ROS production induced by oleic, linoleic, and γ -linolenic acids in human and rat neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.* **41**, 1124–1132 (2006).
 221. Brinkmann, V., Laube, B., Abed, U. A., Goosmann, C. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: How to generate and visualize them. *J. Vis. Exp.* 1724 (2010) doi:10.3791/1724.
 222. Arenas-Hernandez, M., Sanchez-Rodriguez, E. N., Mial, T. N., Robertson, S. A. & Gomez-Lopez, N. Isolation of leukocytes from the murine tissues at the maternal-fetal interface. *J. Vis. Exp.* **2015**, 52866 (2015).
 223. Lanciotti, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1232–1239 (2008).
 224. JR, W., P, O. & M, M. High recovery FASP applied to the proteomic analysis of microdissected formalin fixed paraffin embedded cancer tissues retrieves known colon cancer markers. *J. Proteome Res.* **10**, 3040–3049 (2011).
 225. JC, S., MV, G., GZ, L., JP, V. & SJ, G. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 144–156 (2006).
 226. JP, V., JI, L. & JM, A. Analysis and quantification of diagnostic serum markers and protein signatures for Gaucher disease. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 755–766 (2007).
 227. AM, B., M, L. & B, U. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
 228. JT, S. & R, D. Efficient de novo assembly of large genomes using compressed data

- structures. *Genome Res.* **22**, 549–556 (2012).
229. Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C. & Salzberg, S. L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* **2019** *37* **37**, 907–915 (2019).
 230. G, B. *et al.* Simulation-based comprehensive benchmarking of RNA-seq aligners. *Nat. Methods* **14**, 135–139 (2017).
 231. S, A., PT, P. & W, H. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
 232. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014** *15* **15**, 1–21 (2014).
 233. Mi, H. *et al.* Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nat. Protoc.* **2019** *14* **14**, 703–721 (2019).
 234. Moreno-Altamirano, M. M. B., Rodríguez-Espinosa, O., Rojas-Espinosa, O., Pliego-Rivero, B. & Sánchez-García, F. J. Dengue Virus Serotype-2 Interferes with the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Intervirology* **58**, 250–259 (2015).
 235. Zhang, Z. *et al.* Infectious Progeny of 2009 A (H1N1) influenza virus replicated in and released from human neutrophils. *Sci. Rep.* **5**, 1–11 (2015).
 236. Hiroki, C. H. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Effectively Control Acute Chikungunya Virus Infection. *Front. Immunol.* **10**, (2020).
 237. Lim, K. *et al.* In situ neutrophil efferocytosis shapes T cell immunity to influenza infection. *Nat. Immunol.* **21**, 1046–1057 (2020).
 238. Henrique, M. O. *et al.* Evaluation of inflammatory skin infiltrate following *Aedes aegypti* bites in sensitized and non-sensitized mice reveals saliva-dependent and immune-dependent phenotypes. *Immunology* **158**, 47–59 (2019).
 239. Lum, F. M. *et al.* Immunological observations and transcriptomic analysis of trimester-specific full-term placentas from three Zika virus-infected women. *Clin. Transl. Immunol.* **8**, 1–15 (2019).
 240. Stillie, R., Farooq, S. M., Gordon, J. R. & Stadnyk, A. W. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 529–543 (2009).
 241. Hufford, M. M. *et al.* Influenza-Infected Neutrophils within the Infected Lungs Act as Antigen Presenting Cells for Anti-Viral CD8+ T Cells. *PLoS One* **7**, e46581 (2012).
 242. Peine, M., Marek, R. M. & Löhning, M. IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. *Trends Immunol.* **37**, 321–333 (2016).
 243. Eberlein, J. *et al.* Aging promotes acquisition of naive-like CD8+ memory T cell traits and enhanced functionalities. *J. Clin. Invest.* **126**, 3942 (2016).
 244. Quie, P. G., White, J. G., Holmes, B. & Good, R. A. In Vitro Bactericidal Capacity of Human Polymorphonuclear Leukocytes: Diminished Activity in Chronic Granulomatous Disease of Childhood. *J. Clin. Invest.* **46**, 668 (1967).
 245. K, W., C, Z. & DC, D. Severe congenital neutropenia. *Semin. Hematol.* **43**, 189–195 (2006).
 246. Hackemann, M. M. A., Denman, A. M. & Tyrrell, D. A. J. Inactivation of influenza virus by human lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **16**, 583 (1974).
 247. BT, R., LA, B. & PM, H. Neutrophils are mediators of antiviral immunity. *Experientia* **34**, 346–348 (1978).

248. P, R., A, V. & TU, K. Depression of human neutrophil motility by influenza virus in vitro. *Scand. J. Immunol.* **6**, 897–906 (1977).
249. J, Z., SA, S., DR, H. & NW, M. Neutrophils promote mononuclear cell infiltration during viral-induced encephalitis. *J. Immunol.* **170**, 3331–3336 (2003).
250. TM, T., SH, C., JE, O. & RN, L. Neutrophil-mediated suppression of virus replication after herpes simplex virus type 1 infection of the murine cornea. *J. Virol.* **70**, 898–904 (1996).
251. M, M. *et al.* Activation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 on human neutrophils by marburg and ebola viruses. *J. Virol.* **80**, 7235–7244 (2006).
252. Opasawatchai, A. *et al.* Neutrophil activation and early features of net formation are associated with dengue virus infection in human. *Front. Immunol.* **10**, 3007 (2019).
253. O, R.-E., O, R.-E., MM, M.-A., EO, L.-V. & FJ, S.-G. Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. *Immunology* **145**, 213–224 (2015).
254. S, D. *et al.* Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **280**, (2001).
255. Hastings, A. K. *et al.* Aedes aegypti NeSt1 Protein Enhances Zika Virus Pathogenesis by Activating Neutrophils. *J. Virol.* **93**, (2019).
256. D, M., P, A., K, G., A, B. & E, H. CD14 + CD16 + monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat. Microbiol.* **2**, 1462–1470 (2017).
257. Foo, S.-S. *et al.* Asian Zika virus strains target CD14 + blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy HHS Public Access. **2**, 1558–1570 (2017).
258. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731–2738 (2004).
259. Boivin, G. *et al.* Durable and controlled depletion of neutrophils in mice. *Nat. Commun.* **11**, 1–9 (2020).
260. J, Z. *et al.* Immunophenotyping and activation status of maternal peripheral blood leukocytes during pregnancy and labour, both term and preterm. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 2386–2402 (2017).
261. R, L., S, S., R, A. & R, P. Granulocyte superoxide anion production and regulation by plasma factors in normal and preeclamptic pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* **89**, 199–206 (2011).
262. K, S. & GD, H. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, (2008).
263. QL, Z. *et al.* Akt substrate TBC1D1 regulates GLUT1 expression through the mTOR pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* **411**, 647–655 (2008).
264. AFA, H. *et al.* WNK1 phosphorylation sites in TBC1D1 and TBC1D4 modulate cell surface expression of GLUT1. *Arch. Biochem. Biophys.* **679**, (2020).
265. Steinbusch, L. K. M. *et al.* Subcellular trafficking of the substrate transporters GLUT4 and CD36 in cardiomyocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2525 (2011).
266. Maher, K. *et al.* A Role for Stefin B (Cystatin B) in Inflammation and Endotoxemia *. *J. Biol. Chem.* **289**, 31736–31750 (2014).
267. Butinar, M. *et al.* Stefin B deficiency reduces tumor growth via sensitization of tumor cells to oxidative stress in a breast cancer model. *Oncogene* **2014 3326** **33**, 3392–3400 (2013).
268. K, C., NJ, S., U, F., SP, W. & JM, C. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **308**, 1643–1645 (2005).

269. K, G. *et al.* Cathepsins B and L activate Ebola but not Marburg virus glycoproteins for efficient entry into cell lines and macrophages independent of TMPRSS2 expression. *Virology* **424**, 3–10 (2012).
270. A, M., T, R. & H, F. Cathepsin B & L are not required for ebola virus replication. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).
271. Bossowska-Nowicka, M. *et al.* Ectromelia virus suppresses expression of cathepsins and cystatins in conventional dendritic cells to efficiently execute the replication process. *BMC Microbiol.* 2019 191 **19**, 1–17 (2019).
272. Q, Z. *et al.* Annexin A3 upregulates the infiltrated neutrophil-lymphocyte ratio to remodel the immune microenvironment in hepatocellular carcinoma. *Int. Immunopharmacol.* **89**, (2020).
273. SE, M. & RO, M. The annexins. *Genome Biol.* **5**, (2004).
274. Nadkarni, S. *et al.* Neutrophils induce proangiogenic T cells with a regulatory phenotype in pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E8415–E8424 (2016).
275. T, D., S, K., A, P., S, R. & DR, S. Proteomic analysis of monkey kidney LLC-MK2 cells infected with a Thai strain Zika virus. *Arch. Virol.* **164**, 725–737 (2019).
276. He, S. *et al.* Annexin A2 Modulates ROS and Impacts Inflammatory Response via IL-17 Signaling in Polymicrobial Sepsis Mice. *PLOS Pathog.* **12**, e1005743 (2016).
277. Yang, L., Lu, P., Yang, X., Li, K. & Qu, S. Annexin A3, a Calcium-Dependent Phospholipid-Binding Protein: Implication in Cancer. *Front. Mol. Biosci.* **0**, 700 (2021).
278. V, L. C. & I, M.-P. Annexin 3 is associated with cytoplasmic granules in neutrophils and monocytes and translocates to the plasma membrane in activated cells. *Biochem. J.* **303** (Pt 2), 481–487 (1994).
279. Rösch, K. *et al.* Quantitative Lipid Droplet Proteome Analysis Identifies Annexin A3 as a Cofactor for HCV Particle Production. *Cell Rep.* **16**, 3219–3231 (2016).
280. Dahl, S. L. *et al.* Lipocalin-2 Functions as Inhibitor of Innate Resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Front. Immunol.* **0**, 2717 (2018).
281. Noçon, A. L. *et al.* The Bacteriostatic Protein Lipocalin 2 Is Induced in the Central Nervous System of Mice with West Nile Virus Encephalitis. *J. Virol.* **88**, 679 (2014).
282. L, L. *et al.* Decreased serum lipocalin-2 levels in human immunodeficiency virus-infected patients: increase during highly active anti-retroviral therapy. *Clin. Exp. Immunol.* **152**, 57–63 (2008).
283. Agier, J., Efenberger, M. & Brzezińska-Błaszczyk, E. Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Cent. J. Immunol.* **40**, 225 (2015).
284. PG, B. *et al.* Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37. *PLoS One* **6**, (2011).
285. P, B., L, W.-J., K, B., B, A. & J, S. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Curr. HIV Res.* **5**, 410–415 (2007).
286. SM, C. *et al.* The human cathelicidin LL-37 has antiviral activity against respiratory syncytial virus. *PLoS One* **8**, (2013).
287. Wang, S. *et al.* S100A8/A9 in Inflammation. *Front. Immunol.* **0**, 1298 (2018).
288. Ryckman, C. *et al.* HIV-1 Transcription and Virus Production Are Both Accentuated by the Proinflammatory Myeloid-Related Proteins in Human CD4+ T Lymphocytes. *J. Immunol.* **169**, 3307–3313 (2002).
289. Guo, Q. *et al.* Induction of alarmin S100A8/A9 mediates activation of aberrant neutrophils in the pathogenesis of COVID-19. *Cell Host Microbe* **29**, 222–235

- (2021).
290. Quoc, Q. L. *et al.* S100A9 in adult asthmatic patients: a biomarker for neutrophilic asthma. *Exp. Mol. Med.* 2021 537 **53**, 1170–1179 (2021).
 291. MH, P., M, J., YR, K., CK, L. & JT, H. Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. *Pharmacol. Ther.* **163**, 1–23 (2016).
 292. Oberley, T. D., Verwiebe, E., Zhong, W., Kang, S. W. & Rhee, S. G. Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 412–424 (2001).
 293. Yamashita, H. *et al.* Characterization of Human and Murine PMP20 Peroxisomal Proteins That Exhibit Antioxidant Activity in Vitro *. *J. Biol. Chem.* **274**, 29897–29904 (1999).
 294. Karpenko, I. L., Valuev-Elliston, V. T., Ivanova, O. N., Smirnova, O. A. & Ivanov, A. V. Peroxiredoxins—The Underrated Actors during Virus-Induced Oxidative Stress. *Antioxidants* **10**, (2021).
 295. Sachs, U. J. H. *et al.* The Neutrophil-specific Antigen CD177 Is a Counter-receptor for Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) *. (2007) doi:10.1074/jbc.M701120200.
 296. Bai, M. *et al.* CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation. *Blood* **130**, 2092 (2017).
 297. P, L., GB, M. & FH, A. NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *J. Clin. Invest.* **50**, 1108–1115 (1971).
 298. Bayat, B. Molecular basis of human neutrophil antigen 2 (HNA-2) expression. *ISBT Sci. Ser.* **15**, 77–81 (2020).
 299. L, C., M, B., K, M., V, S. & D, S. Expression of human neutrophil antigen-2a (NB1) is increased in pregnancy. *Transfusion* **43**, 357–363 (2003).
 300. Tang, B. M. *et al.* Neutrophils-related host factors associated with severe disease and fatality in patients with influenza infection. *Nat. Commun.* 2019 101 **10**, 1–13 (2019).
 301. Lévy, Y. *et al.* CD177, a specific marker of neutrophil activation, is a hallmark of COVID-19 severity and death. *medRxiv* 2020.12.12.20246934 (2020) doi:10.1101/2020.12.12.20246934.
 302. Kotliar, D. *et al.* Single-Cell Profiling of Ebola Virus Disease In Vivo Reveals Viral and Host Dynamics. *Cell* **183**, 1383 (2020).
 303. Kallas, E. G. *et al.* Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **19**, 750–758 (2019).
 304. Khabar, K. S. A. *et al.* The α Chemokine, Interleukin 8, Inhibits the Antiviral Action of Interferon α . *J. Exp. Med.* **186**, 1077 (1997).
 305. Wagoner, J. *et al.* Regulation of CXCL-8 (Interleukin-8) Induction by Double-Stranded RNA Signaling Pathways during Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* **81**, 309–318 (2007).
 306. Pollicino, T. *et al.* Hepatitis B virus (HBV) induces the expression of interleukin-8 that in turn reduces HBV sensitivity to interferon-alpha. *Virology* **444**, 317–328 (2013).
 307. N, M. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **284**, (2003).
 308. Camacho-Zavala, E. *et al.* Pregnant Women Infected with Zika Virus Show Higher Viral Load and Immunoregulatory Cytokines Profile with CXCL10 Increase. *Viruses* 2021, Vol. 13, Page 80 **13**, 80 (2021).

309. K, L. *et al.* Neutrophil trails guide influenza-specific CD8⁺ T cells in the airways. *Science* **349**, (2015).
310. Tate, M. D., Brooks, A. G., Reading, P. C. & Mintern, J. D. Neutrophils sustain effective CD8 T-cell responses in the respiratory tract following influenza infection. *Immunol. Cell Biol.* **90**, 197–205 (2012).
311. D, D. *et al.* Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8⁺ T cells. *Immunity* **37**, 917–929 (2012).
312. T, T. *et al.* Neutrophil-mediated Suppression of Influenza-induced Pathology Requires CD11b/CD18 (MAC-1). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **58**, 492–499 (2018).
313. Aarts, C. E. M. *et al.* Neutrophils as Suppressors of T Cell Proliferation: Does Age Matter? *Front. Immunol.* **0**, 2144 (2019).
314. Minns, D., Smith, K. J., Hardisty, G., Rossi, A. & Findlay, E. G. The outcome of neutrophil-T cell contact differs depending on activation status of both cell types. *Front. Immunol.* **12**, (2020).
315. D, W. & A, S. T-cell immunity to infection with dengue virus in humans. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
316. Wen, J. *et al.* Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8⁺ T cells. *Nat. Microbiol.* **2**, (2017).
317. M, M. *et al.* Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* **171**, 3154–3162 (2003).
318. K, F. *et al.* The cytoplasmic ‘linker region’ in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int. Immunol.* **16**, 1143–1154 (2004).
319. M, M., S, K., M, K., K, M. & T, S. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1364–1369 (2002).
320. M, Y. *et al.* Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* **169**, 6668–6672 (2002).
321. H, O., M, M., K, F., T, A. & T, S. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat. Immunol.* **4**, 161–167 (2003).
322. M, Y. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640–643 (2003).
323. A, T. & T, T. New aspects of IFN-alpha/beta signalling in immunity, oncogenesis and bone metabolism. *Cancer Sci.* **94**, 405–411 (2003).
324. T, C., ND, P. & C, L. W. NFKB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J.* **283**, 1812–1822 (2016).
325. MS, H. & S, G. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008).
326. None, I., None, C., C, M. & G, N. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 355–383 (2005).
327. W, S., PJ, M., A, K. & T, W. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 9–20 (2006).
328. KD, S. *et al.* Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* **4**, 1247–1253 (2003).
329. Prchal-Murphy, M. *et al.* TYK2 Kinase Activity Is Required for Functional Type

- I Interferon Responses In Vivo. *PLoS One* **7**, e39141 (2012).
330. Sullivan, L. C. *et al.* Recognition of the Major Histocompatibility Complex (MHC) Class Ib Molecule H2-Q10 by the Natural Killer Cell Receptor Ly49C. *J. Biol. Chem.* **291**, 18740 (2016).
 331. Nakagawa, H., Wang, L., Cantor, H. & Kim, H. J. *New Insights Into the Biology of CD8 Regulatory T Cells. Advances in Immunology* vol. 140 (Elsevier Inc., 2018).
 332. Whyte, C. E. *et al.* Context-dependent effects of IL-2 rewire immunity into distinct cellular circuits. *bioRxiv* (2020) doi:10.1101/2020.12.18.423431.
 333. Pellegrino, M., Crinò, A., Rosado, M. M. & Fierabracci, A. Identification and functional characterization of CD8 + T regulatory cells in type 1 diabetes patients. *PLoS One* **14**, 1–20 (2019).
 334. Churlaud, G. *et al.* Human and mouse CD8+CD25+FOXP3+ regulatory T cells at steady state and during interleukin-2 therapy. *Front. Immunol.* **6**, 171 (2015).
 335. Lee, J. *et al.* Induction of Immunosuppressive CD8 + CD25 + FOXP3 + Regulatory T Cells by Suboptimal Stimulation with Staphylococcal Enterotoxin C1. *J. Immunol.* **200**, 669–680 (2018).
 336. Zhang, S. *et al.* Analysis of CD8+ Treg cells in patients with ovarian cancer: A possible mechanism for immune impairment. *Cell. Mol. Immunol.* **12**, 580–591 (2015).
 337. Akane, K., Kojima, S., Mak, T. W., Shiku, H. & Suzuki, H. CD8 + CD122 + CD49d low regulatory T cells maintain T-cell homeostasis by killing activated T cells via Fas/FasL-mediated cytotoxicity . *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 2460–2465 (2016).
 338. Liu, H. *et al.* Suppression of allograft rejection by CD8+CD122+PD-1+ Tregs is dictated by their Fas ligand-initiated killing of effector T cells versus Fas-mediated own apoptosis. *Oncotarget* **8**, 24187–24195 (2017).
 339. Kim, H.-J. *et al.* Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science (80-.)*. **350**, 334–339 (2015).
 340. Mishra, S. *et al.* TGF- β and Eomes control the homeostasis of CD8+regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **218**, (2020).
 341. Wu, M. *et al.* TGF- β 1 contributes to CD8 + Treg induction through p38 MAPK signaling in ovarian cancer microenvironment. *Oncotarget* **7**, 44534–44544 (2016).
 342. Izawa, A. *et al.* A Novel Alloantigen-Specific CD8+PD1+ Regulatory T Cell Induced by ICOS-B7h Blockade In Vivo. *J. Immunol.* **179**, 786–796 (2007).
 343. C, S. *et al.* The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* **513**, 564–568 (2014).
 344. Bonilla, W. V. *et al.* The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8+ T cell responses. *Science (80-.)*. **335**, 984–989 (2012).
 345. Xu, L. *et al.* IL33 activates CD8+T and NK cells through MyD88 pathway to suppress the lung cancer cell growth in mice. *Biotechnol. Lett.* **2020 427 42**, 1113–1121 (2020).
 346. Y, X. *et al.* Endogenous IL-33 exerts CD8 + T cell antitumor responses overcoming pro-tumor effects by regulatory T cells in a colon carcinoma model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **518**, 331–336 (2019).
 347. JH, D. *et al.* Cytokine- and TCR-Mediated Regulation of T Cell Expression of Ly6C and Sca-1. *J. Immunol.* **200**, ji1701154 (2018).
 348. A, H., M, M., C, A., DJ, M. & S, J. Ly6C supports preferential homing of central

- memory CD8⁺ T cells into lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* **41**, 634–644 (2011).
349. Lee, J. Y. *et al.* Phenotypic and Functional Changes of Peripheral Ly6C⁺ T Regulatory Cells Driven by Conventional Effector T Cells. *Front. Immunol.* **0**, 437 (2018).
350. Z, S. *et al.* Human CD8⁺CXCR3⁺ T cells have the same function as murine CD8⁺CD122⁺ Treg. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2106–2119 (2009).

ANEXOS

Anexo 1: Comitê de Ética CEUA ICB USP – Projeto células T CD8



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DE LINFÓCITOS T CD8+ NA INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS**", registrado sob o protocolo nº **61/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **21/06/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Jean Pierre Schatzmann Pero**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *David Anibal Garrido Andrade (Pós-doutorando), Carla Longo (Pós-graduando), Cristiano Rossato (Pós-graduando), Wesley Nogueira Brandão (Pós-graduando), Carolina Manganeli Polonio (Pós-graduando), Nagela Ghabdan Zanluqui*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "**Characterization of the role of CD8+ T lymphocytes in Zika virus infection**", protocol nº **61/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **6/21/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

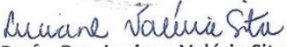
- Principal Investigator: **Dr.(a.) Jean Pierre Schatzmann Pero**

- Team members: *David Anibal Garrido Andrade (Postdoctoral Researcher), Carla Longo (Graduate Student), Cristiano Rossato (Graduate Student), Wesley Nogueira Brandão (Graduate Student), Carolina Manganeli Polonio (Graduate Student), Nagela Ghabdan Zanluqui.*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6 CD8	Macho/male	8-12 semanas/weeks	150
	C57BL/6	Macho/male	8-12 semanas/weeks	150

São Paulo, 24 de junho de 2016.


Prof. Dra. Luciane Valéria Sita
Vice-coordenadora CEUA-ICB/USP


Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Anexo 2: Comitê de Ética CEUA FMUSP – Projeto células T CD8



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DE LINFÓCITOS T CD8+ NA INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS**”, registrada com o nº **064/17**, sob a responsabilidade de **Jean Pierre Schatzman Peron** e **Nagela Ghabdan Zanluqui**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 13.09.2017

Finalidade	(x) Ensino () Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 31-03-2017 Término: 31-01-2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BL/6 e Knockout C57BL/6 CD8KO
Nº de animais	150 C57Bl/6 e 150 Knockout C57Bl/6 CD8KO
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério ICB

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 13 de Setembro de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Anexo 3: Comitê de Ética CEUA ICB USP – Projeto neutrófilos



Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
 Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel dos neutrófilos na infecção por Zika vírus", protocolada sob o CEUA nº 4714050719, sob a responsabilidade de **Jean Pierre Schatzmann Peron e equipe; Nagela Ghabdan Zanluqui; Lilian Gomes de Oliveira ; Carolina Manganeli Polonio ; Marilia Garcia de Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 20/09/2019.

We certify that the proposal "Neutrophils role in Zika virus infection", utilizing 484 Isogenics mice (268 males and 216 females), protocol number CEUA 4714050719, under the responsibility of **Jean Pierre Schatzmann Peron and team; Nagela Ghabdan Zanluqui; Lilian Gomes de Oliveira ; Carolina Manganeli Polonio ; Marilia Garcia de Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 09/20/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: [24 meses](#)

Depto/Setor: [Imunologia](#)

Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 12 semanas	N amostral: 65
Linhagem: C57BL/6			
Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Fêmeas	Idade ou peso: 6 a 12 semanas	N amostral: 108
Linhagem: C57BL/6			
Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 12 semanas	N amostral: 108
Linhagem: AB6			
Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 6 a 12 semanas	N amostral: 95
Linhagem: SJL			
Origem: Biotério do Departamento de Imunologia			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Fêmeas	Idade ou peso: 6 a 12 semanas	N amostral: 108
Linhagem: SJL			

São Paulo, 06 de agosto de 2021



Universidade de São Paulo
Comissão de Ética no
Uso de Animais

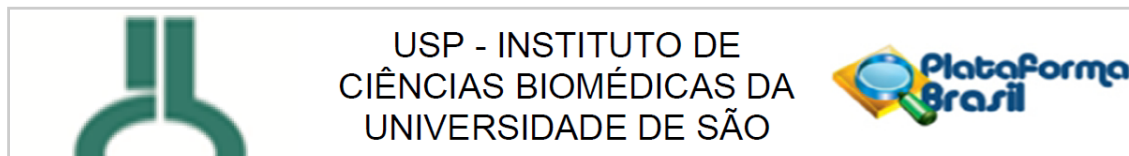
Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Francemilson Goulart da Silva".

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Anexo 4: Comitê de Ética ICB USP – Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMUNOPATOLOGIA, COMORBIDADES E SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA A INFECÇÃO PELO ZIKA VÍRUS EM HUMANOS

Pesquisador: Antonio Condino Neto

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 86696618.7.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.612.149

Apresentação do Projeto:

O projeto é simples e direto nos aspectos laboratoriais. Pertence ao Grupo 4 e envolve várias instituições do nordeste do Brasil: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2) Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Pernambuco, 3) Hospital de Pediatria, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 4) Hospital Albert Sabin de Fortaleza, 5) Universidade do Estado da Bahia, 6) Centro Universitário Estado do Pará. O texto é sucinto e direto. O projeto é viável e interessante.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto visa estudar as vias de síntese e sinalização dos IFNs Tipo I, na tentativa de correlacionar nossos achados publicados recentemente, com possíveis mecanismos de resistência ou susceptibilidade à infecção pelo ZIKV. A causística do projeto envolve pelo menos 10 crianças e respectivas mães nos seguintes grupos: 1) Crianças com microcefalia infectadas pelo ZIKV, 2) Crianças sem microcefalia expostas ao ZIKV, 3) Crianças normais e não expostas ao ZIKV, 4) Crianças com microcefalia e não expostas ao ZIKV.

As crianças serão encaminhadas por médicos colaboradores em Recife, Belém, Salvador e Natal. Será feito o sequenciamento de genes envolvidos (exoma completo) no reconhecimento viral, assim como na síntese e sinalização dos IFNs de tipo I. Serão avaliados os seguintes alvos:

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

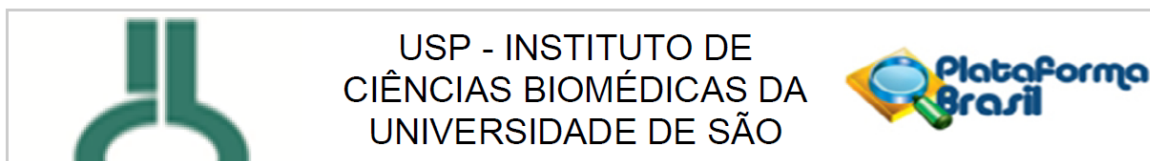
CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 2.612.149

Reconhecimento viral: tlr-3, tlr-7, tlr-8, tlr-9, mda-5, rig-1, gas6, prots.

Síntese de IFNs: trif, traf3, traf6, tbk1, irf3, irf7

Sinalização: ifnr1, jak1, jak2, tyk2, stat1, stat2, irf9.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Serão coletados 3 ml de sangue periférico o que é compatível com a idade das crianças. O risco é o associado à coleta de sangue periférico e os benefícios será o entendimento melhor das cascatas de sinalização de IFNs.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há critérios de inclusão ou exclusão definidos nem como os grupos de estudo foram configurados

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os dois TCLES (maior e menor) são concisos e diretos e incluem contato com o responsável.

Recomendações:

Descrever de forma clara os critérios de exclusão

Modificar as palavras:

sangue venoso - por sangue da veia

Susceptibilidade - aumento de risco

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Descrever os critérios de exclusão conforme solicitado no item recomendações

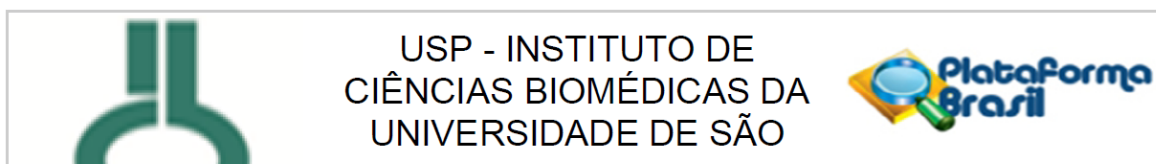
Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	28/03/2018		Aceito

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 **E-mail:** cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 2.612.149

Básicas do Projeto	ETO_1099348.pdf	11:00:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maior_ZIKV_2018.doc	28/03/2018 10:58:02	Antonio Condino Neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_menor_ZIKV_2018.doc	28/03/2018 10:57:51	Antonio Condino Neto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Zika_CEP.pdf	28/03/2018 10:57:41	Antonio Condino Neto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_compromisso_pesquisador.pdf	28/03/2018 10:51:36	Antonio Condino Neto	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_zika.pdf	28/03/2018 10:51:05	Antonio Condino Neto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 20 de Abril de 2018

Assinado por:
Camila Squarzoni Dale
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br