

Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

DANILO CORAZZA

**INFLUÊNCIA DO ATAZANAVIR NAS VIAS INFLAMATÓRIAS EM
NEUROBLASTOS INFECTADOS OU NÃO PELO VÍRUS ZIKA**

BRASÍLIA, DF
2021

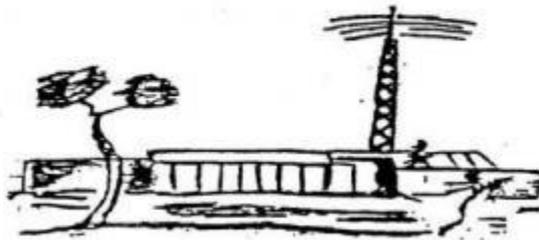
INFLUÊNCIA DO ATAZANAVIR NAS VIAS INFLAMATÓRIAS EM NEUROBLASTOS INFECTADOS OU NÃO PELO VÍRUS ZIKA

DANILO CORAZZA

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Tropical da
Faculdade de Medicina da Universidade
de Brasília como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiana Karla dos Santos Borges



**Brasília, DF
2021**

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Danilo Corazza

INFLUÊNCIA DO ATAZANAVIR NAS VIAS INFLAMATÓRIAS EM NEUROBLASTOS INFECTADOS OU NÃO PELO VÍRUS ZIKA

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Medicina Tropical: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

DATA DA DEFESA DA TESE

26 de fevereiro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira – Universidade de Brasília
(Presidente)

Prof^a. Dr^a. Heliara Maria Spina Canela – Universidade do Rio Verde
(Banca externa)

Prof^a. Dr^a. Selma Aparecida Souza Kückelhaus – Universidade de Brasília
(Banca interna)

Prof^a. Dr^a. Fabiana Pirani Carneiro – Universidade de Brasília
(Banca externa ao programa)

Prof^a. Dr^a. Thaís Tâmara Castro e Souza Minuzzi
(Suplente)

CD186i Corazza, Danilo
INFLUÊNCIA DO ATAZANAVIR NAS VIAS INFLAMATÓRIAS EM
NEUROBLASTOS INFECTADOS OU NÃO PELO VÍRUS ZIKA / Danilo
Corazza; orientador Maria Imaculada Muniz Junqueira; co
orientador Tatiana Karla dos Santos Borges. -- Brasília,
2021.
181 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2021.

1. Zika. 2. Atazanavir. 3. Neuroblasto. 4. EROs e ERNs.
5. Citocinas. I. Muniz Junqueira, Maria Imaculada, orient.
II. Karla dos Santos Borges, Tatiana, co-orient. III. Título

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular, área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília-DF e foi realizado com recursos parcialmente providos da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), processo número: 0193.001468/2016. Pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPQ), processo número: 440844/2016-9. Pela MCTIC/FNDCT/CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit, processo número: 440844-2016-9, e com o apoio de bolsa de estudos concedida pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES).

Na busca objetiva pela saúde dos corpos e mentes dos homens, a ciência médica vai além e atinge em cheio os espíritos, cujo ânimo se renova perante cada descoberta. O bastão de Asclépio carrega, invisível, a luz de uma esperança que jamais morrerá enquanto existirem pesquisadores sinceros que se dedicam a buscar cura e alívio para os males que castigam a humanidade que sofre.

Sônia Zaghetto

DEDICATÓRIA

Seria impossível finalizar este trabalho sem mencionar meus pais, Heitor e Rubenita, não fosse por vocês eu não estaria aqui! Agradeço todos os dias pelo dom da vida, pelo apoio incondicional e por me ensinarem a ser um ser humano melhor a cada dia!

MUITO OBRIGADO!

Gostaria de dedicar também este trabalho a minha querida orientadora Maria Imaculada! Sei que foram momentos difíceis, muito trabalho envolvido, dificuldades e adversidades que apareciam a cada momento que o trabalho era desenvolvido! Agradeço muito pela paciência, pela perseverança não só no trabalho, mas também comigo! Espero no futuro fazer jus à profissional que você é! MUITO OBRIGADO!

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Murilo e Luiz Fernando, por todo o incentivo e apoio durante essa jornada e a vida!

A minha cunhada Ludimila, pelos momentos de alegria e inspiração!

A minha querida amiga Tatiana Karla, por todos os nossos momentos durante este trabalho e pela vida! Admiro muito você, sua forma de viver e te considero um exemplo a ser seguido, muito obrigado!

A Família Victor! Que ficou maior durante essa tese! Amo muito vocês e agradeço sempre por todos os momentos e por serem pessoas admiráveis!

Ao meu querido amigo, Lucas “Braga” Fraga, essa tese não teria chegado em 50% se não fosse por você, muito obrigado por tudo! Saiba que sempre estarei pronto para te apoiar em qualquer que seja sua decisão! Muito obrigado!!

Ao querido Arthur Fortuna, pelos momentos e doces partilhados, e além disso, por fazer um amigo muito feliz!

A minha companheira de doutorado, Mayara, demorou, mas aqui estou, finalizando também! Muito obrigado por tudo!

A minha querida amiga, Luciana, por todos os momentos e pelo incentivo em todos os momentos! Muito obrigado!

A querida amiga Andreia, por todos os momentos de alegria e descontração! Muito obrigado!

A querida amiga Isabela “Nut”, por todos os momentos de alegria e constante conhecimento!

As queridas Shirley Claudino e Mariângela Souza, pelas ajudas e pelos momentos partilhados nessa trajetória! Muito obrigado!

Às amigas Evelin Oliveira, Evelyn Pereira e Rebeca Pinho, e lá se vão mais alguns anos! Famílias maiores e muita história neste caminho! Obrigado pelas palavras de apoio! Amo vocês!

Ao João Victor, por todos os momentos partilhados, pelas constantes inspirações! O mundo é pequeno para você! Tenho certeza que tudo que desejar será alcançado tamanha a sua dedicação! Tenho um amor e admiração imensa pela pessoa que você é! Muito obrigado por tudo!

A querida Dona Maria, pelos constantes “puxões” de orelha, pelas palavras direcionadas e sempre muito bem colocadas! Sua sabedoria é imensa, e agradeço sempre por ter lhe conhecido, espero que um dia eu consiga ser um profissional como você! Muito obrigado por tudo!

Aos queridos amigos José Hítallo, João Pedro, Luizmar, Lucas, João Victor, Eric, Marco Túlio e Marianne agradeço pelos momentos juntos, pelas inspirações e por me manterem no foco até quando eu pensava em desviar! Muito obrigado por tudo!

Às queridas amigas Vera Rana, Maria “Marrie” Luiza, e Ana Paula pelos momentos partilhados e pelos muitos que virão! Muito obrigado!

Aos queridos amigos, João “Skuul” Paulo, André “Comshepard” Sgobi, Elvis “Elve” Mattje e Luiz “Lhesp” Espicalsky, pelos momentos de distração, pelas ajudas em difíceis momentos e por todas as risadas partilhadas! Muito obrigado!

To both of my dearest friends, Dave “Bok” and Deanna “Roro”, thank you so much for being there when I needed you most! Thanks for the lazy moments, the funny ones, and you know... someday I’ll visit for sure! Lol! Love you both!! Thank you very much!

Ao professor Dr. Alexandre Vieira Machado e ao instituto René Rachou-FIOCRUZ- MG, por ceder o isolado do vírus Zika e o treinamento para correto manuseio!

A toda equipe do NMT, por toda dedicação no trabalho! Muito obrigado!

E todos amigos, familiares e professores que contribuíram com este trabalho e com minha formação! Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XXI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico, epidemiologia e vetor	2
1.2 Vírus	3
1.3 Imunidade	4
1.4 Patogenia	6
1.5 Citocinas	7
1.6 Via do NF- κ B	11
1.7 Radicais de Oxigênio	12
1.8 Óxido Nítrico	14
1.9 Antirretrovirais	15
1.10 Morte Celular	17
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	20
4. METODOLOGIA	22
4.1 Delineamento experimental	23
4.2 Neuroblasto SK-N-BE (2)	23
4.3 Células Vero	24
4.4 Células C6/36	24
4.5 Vírus Zika	24
4.6 Cultivo de células e preparo para a titulação	25
4.7 Titulação viral	25
4.8 Infecção das células	26
4.9 Microscopia eletrônica de transmissão	27

4.10	Determinação de óxido nítrico	27
4.11	Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio	28
4.12	Determinação das citocinas	28
4.13	Detecção de proteínas caspase-3	29
4.14	Avaliação da morte dos neuroblastos por anexina/iodeto de propídio	30
4.15	Avaliação da viabilidade por MTT	30
4.16	Análise estatística	31
5.	RESULTADOS	33
6.	DISCUSSÃO	126
7.	CONCLUSÃO	140
8.	REFERÊNCIAS	144

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN – ácido desoxirribonucleico
ARN - Ácido ribonucleico
FITC – isotiocianato de fluoresceína (fluorocromo)
FNT-α – fator de necrose tumoral alfa
OMS – Organização Mundial da Saúde
IKK – cinase inibidora da cinase κ B (variantes α , β , δ)
IFN-γ – interferon- γ
IL – interleucina
iNOS – óxido nítrico sintase induzível
IC – Índice corpuscular
Ig - Imunoglobulina
LPS - Lipopolissacarídeo
NEMO – modulador essencial dos fatores nucleares κ B
NF-κB – Fator nuclear- κ B (elemento que se liga aos elementos- κ B no ADN)
NO – Óxido Nítrico
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	33
Atividade viral na célula e princípio de oxiptose.	
Figura 2	36
Efeito sugerido dos antirretrovirais no vírus Zika e na atividade inflamatória.	
Figura 3	44
Neuroblastos SK-N-BE (2)	
Figura 4	46
Placa de titulação.	
Figura 5	53
Avaliação da presença da infecção pelo vírus Zika em neuroblastos.	
Figura 6	54
Avaliação da presença da infecção pelo vírus Zika em neuroblastos.	
Figura 7	55
Avaliação da infecção do vírus Zika no neuroblasto.	
Figura 8	56
Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h, pelo teste do MTT.	
Figura 9	57
Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h, avaliada pelo teste do MTT.	
Figura 10	58
Influência do tratamento com o atazanavir (1 e 3 μ M) sobre a viabilidade dos neuroblastos incubados com o vírus Zika (MOI 0,1 e 1) em cultura por 24h, pelo teste do MTT.	
Figura 11	59
Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na apoptose dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 12	60
Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) na apoptose dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 13	61
Influência do vírus Zika (MOI 0,1) e do atazanavir (1 e 3 μ M) na apoptose dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 14	62
Influência do vírus Zika (MOI 1) e do atazanavir (1 e 3 μ M) na apoptose dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 15	63
Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na necrose dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 16	64
Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) na necrose dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 17	65
Influência do vírus Zika (MOI 0,1) do atazanavir (1 e 3 μ M) na necrose dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 18	66
Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) na necrose dos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus ZIKA.	
Figura 19	67
Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na ativação da caspase-3 nos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 20	68
Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) na ativação da caspase-3 nos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 21	69
Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) na ativação da caspase-3 dos neuroblastos em cultura por 24h na presença do vírus Zika (MOI 0,1).	

Figura 22	70
Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) ativação da caspase-3 nos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika.	
Figura 23	71
Influência do indutor do NF-kB (PMA), na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1), na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 24	72
Influência do inibidor do NF-kB (JSH-23) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 25	73
Influência do indutor da autofagia (PP242) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 26	73
Influência do inibidor da autofagia (Pepstatina) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 27	74
Influência do inibidor de ERNs (APDC) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 28	75
Influência do indutor de ERNs (LPS) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 29	76
Influência do inibidor de EROs (Diapocinina) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 30	77
Influência do indutor de EROs (Zymosan) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 31	78
Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 32	79
Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 33	80
Influência do vírus Zika (MOI 0,1) e do atazanavir (1 μ M) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 34	80
Influência do vírus Zika (MOI 1) e do atazanavir (1 μ M) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 35	81
Influência do estímulo (PMA) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 36	82
Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) na presença de estímulo (PMA) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 37	82
Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na presença de estímulo (PMA) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 38	83
Influência do inibidor (Diapocinina) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 39	84
Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) na presença do inibidor (Diapocinina) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 40	84
Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) e inibidor (Diapocinina) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	

Figura 41	85
Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 42	86
Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) na produção de ERNs dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 43	87
Influência do vírus Zika (MOI 0,1) e do atazanavir (1 μ M) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 44	87
Influência do vírus Zika (MOI 1) e do atazanavir (1 μ M) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 45	88
Influência do indutor (LPS) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 46	88
Influência do indutor (LPS) e do atazanavir (1 e 3 μ M) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 47	89
Influência do indutor (LPS) e do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 48	89
Influência do inibidor (APDC) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 49	90
Influência do inibidor (APDC) e do atazanavir (1 e 3 μ M) na produção de ERNs dos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 50	90
Influência do inibidor (APDC) e do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 51	91
Influência do vírus Zika nas proporções de 0,1 e 1 MOI sobre a produção de IL-1 β pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 52	92
Influência do Atazanavir (1 e 3 μ M) sobre a produção de IL-1 pelos neuroblastos em cultura por 24h	
Figura 53	93
Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) sobre a produção de IL-1 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 54	94
Influência do ATZ 3 x MOI 0,1 sobre a produção de IL-1 β pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 55	95
Influência do ATZ 1 x MOI 1 sobre a produção de IL-1 β pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 56	96
Influência do ATZ 3 x MOI 1 sobre a produção de IL-1 β pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 57	97
Influência do APDC sobre a produção de IL-1 β pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 58	98
Influência do MOI 0,1 + APDC sobre a produção de IL-1 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 59	99
Influência da diapocinina sobre a produção de IL-1 β pelos neuroblastos em cultura por 24h.	

Figura 60	100
Influência do vírus Zika nas proporções de 0,1 e 1 sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 61	101
Influência do atazanavir nas concentrações de 1 e 3 µM sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 62	102
Influência do atazanavir na concentração de 1 µM sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 MOI do vírus Zika.	
Figura 63	103
Influência do atazanavir na concentração de 3 µM sobre a produção de TNF pelos neuroblastos incubados por 24h em cultura com 0,1 do vírus Zika.	
Figura 64	104
Influência do atazanavir na concentração de 1 µM sobre a produção de TNF pelos neuroblastos incubados em cultura por 24h com 1 MOI do vírus Zika.	
Figura 65	105
Influência do atazanaver sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika.	
Figura 66	106
Influência do APDC sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 67	107
Influência da diapocinina sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 68	108
Influência da diapocinina sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 Moi do vírus Zika.	
Figura 69	109
Influência do vírus Zika nas proporções de 0,1 e 1 MOI sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 70	110
Influência do atazanavir nas concentrações de 1 e 3 µM sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 71	111
Influência do atazanavir (1µM) sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h, na presença de 0,1 MOI do vírus Zika.	
Figura 72	112
Influência do atazanavir (3 µM) e do vírus Zika (MOI 0,1) sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 73	113
Influência do atazanavir (1 µM) sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 Moi do vírus Zika.	
Figura 74	114
Influência do atazanavir (3 µM) sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika.	
Figura 75	115
Influência da inibição de espécies reativas de oxigênio pelo APDC sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 76	116
Influência da Diapocinina sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 77	117
Influência do vírus Zika nas proporções de 0,1 e 1 MOI sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 78	118
Influência do atazanavir nas concentrações de 1 e 3 µM sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	

Figura 79	119
Influência do atazanavir (1 µM) sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 MOI do vírus Zika.	
Figura 80	120
Influência do atazanavir (3 µM) sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 MOI do vírus Zika.	
Figura 81	121
Influência do atazanavir (1 µM) sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika.	
Figura 82	122
Influência do atazanavir (3 µM) sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika.	
Figura 83	123
Influência do APDC sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 84	124
Influência do APDC sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h incubados com 0,1 MOI do vírus Zika.	
Figura 85	125
Influência da inibição da produção de EROs com o APDC sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika.	
Figura 86	126
Influência da inibição das espécies reativas de oxigênio pela incubação com o APDC sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h tratados com o atazanavir (1 µM).	
Figura 87	127
Influência da inibição da produção de radicais de oxigênio pelo APDC sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h tratados com 3 µM de atazanavir.	
Figura 88	128
Influência da inibição da produção de radicais de nitrogênio pela diapocinina sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 89	129
Influência da inibição da produção de espécies reativas de nitrogênio pela diapocinina sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h com 0,1 MOI do vírus Zika.	
Figura 90	130
Influência do vírus Zika nas proporções de 0,1 e 1 MOI sobre a produção de IL-10 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 91	131
Influência do atazanavir nas concentrações de 1 e 3 µM sobre a produção de IL-10 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 92	132
Influência do atazanavir (1µM) sobre a produção de IL-10 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 MOI do vírus Zika.	
Figura 93	133
Influência do atazanavir (3µM) sobre a produção de IL-10 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 Moi do vírus Zika.	
Figura 94	134
Influência do atazanavir (1µM) sobre a produção de IL-10 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika.	
Figura 95	135
Influência do atazanavir (3µM) sobre a produção de IL-10 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika.	
Figura 96	136
Influência do vírus Zika nas proporções de 0,1 e 1 MOI sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 97	137

Influência do atazanavir nas concentrações de 1 e 3 μ M sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 98	138
Influência do atazanavir (1 μ M) na produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença do vírus Zika (MOI 0,1).	
Figura 99	139
Influência do atazanavir (3 μ M) sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença do vírus Zika (MOI 0,1).	
Figura 100	140
Influência do atazanavir (1 μ M) sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença do vírus Zika (MOI 1).	
Figura 101	141
Influência do atazanavir (3 μ M) sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença do vírus Zika (MOI 1).	
Figura 102	142
Influência do APDC sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 103	143
Influência do APDC sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 MOI do vírus Zika.	
Figura 104	144
Influência da diapocinina sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h.	
Figura 105	145
Influência diapocinina sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 MOI do vírus Zika.	

RESUMO

Mesmo sendo relativamente novo, o vírus Zika descoberto em 1947 foi protagonista de diversos surtos, dentre eles o do Brasil (2015) com grande impacto onde foi identificado, causando microcefalia e desordens neurológicas que chamaram a atenção para a sua patogenia. Drogas antirretrovirais como o atazanavir, que são inibidores de protease, possuem atividade contra o vírus Zika, entretanto, pouco se sabe sobre sua ação em neuroblastos infectados ou não, e se são capazes de modificar vias imunológicas que culminem em inflamação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do atazanavir na viabilidade e na produção de radicais livres e na produção de citocinas por linhagens de neuroblastos infectados pelo vírus Zika. A melhor compreensão desses efeitos poderá contribuir para acrescentar novas medidas terapêuticas para diminuir a morbidade da infecção pelo vírus Zika. Para o estudo utilizou-se duas titulações (MOI 0,1 e 1) do isolado do vírus Zika PE/243, duas concentrações do medicamento atazanavir (1 e 3 μM) e neuroblastos SK-N-BE (2). Para avaliar a viabilidade celular utilizou-se o método de redução do MTT por espectrofotometria e por citometria de fluxo avaliou-se a expressão da caspase-3 por teste antígeno-anticorpo, a morte celular por anexina/iodeto de propídio por citometria de fluxo, a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelas sondas DCF-DA e DAF-2DA, respectivamente, e a dosagem das citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e FNT por Kit CBA/BD. Nossos dados mostraram que: 1) a infecção pelo o vírus Zika reduziu a viabilidade dos neuroblastos e 1 μM de atazanavir reverteu parcialmente essa toxicidade 2) a infecção com 1 MOI do vírus Zika causou a morte por necrose e aumentou a expressão de caspase-3, no entanto, a incubação dos neuroblastos com 1 μM de atazanavir reduziu essa expressão; 3) tanto a inibição quanto a indução da via do NF- κB afetaram a viabilidade dos neuroblastos, na presença ou ausência da infecção; 4) a inibição da autofagia causou a redução da viabilidade dos neuroblastos, sendo esta mais evidente na presença da infecção; 5) a infecção pelo vírus Zika inibiu a produção de EROs pelos neuroblastos, mas esta foi parcialmente revertida pelo atazanavir; 6) na presença da infecção 0,1 MOI do vírus reduziu a produção de ERNs e mesmo o atazanavir não foi capaz de reverter essa redução; 7) na presença de 1 MOI do vírus, houve aumento na produção de IL-1, FNT e mais expressiva de IL-6 e IL-8, enquanto houve redução de IL-12p70; 8) o inibidor da produção de ERNs diminuiu acentuadamente a viabilidade da célula, já indutores das EROs também reduziram a viabilidade dos neuroblastos. No conjunto, os resultados sugerem que o atazanavir na concentração 1 μM pode ser um medicamento promissor para proteger o neuroblasto na infecção pelo vírus Zika, contribuindo para diminuir o risco de microcefalia pela diminuição do risco de morte dos neuroblastos na vigência da infecção em gestantes. Entretanto, os é preciso dar continuidade aos estudos para verificar se a ação protetora do Atazanavir nos neuroblastos que observamos in vitro vai persistir em mulheres gestantes infectadas pelo vírus Zika, e se o tratamento poderia prevenir as malformações fetais.

Palavras-chave: Neuroblasto, Zika, atazanavir, ERNs, EROs e citocinas

ABSTRACT

Even though it is relatively new, the Zika virus discovered in 1947 was the protagonist of several outbreaks, among them, the one in Brazil (2015) with great impact, causing microcephaly and neurological disorders that drew attention to its pathogenesis. Antiretroviral drugs such as atazanavir, which are protease inhibitors, have activity against the Zika virus, however, little is known about their action on infected neuroblasts, and whether they are able to modify immune pathways that culminate in inflammation. The objective of this work was to evaluate the influence of atazanavir on viability and production of free radicals and cytokines by neuroblast in vitro. A better understanding of these effects may contribute to the addition of novel therapeutic to reduce the morbidity of Zika virus infection. Two titrations (MOI 0.1 and 1) of the Zika virus isolate PE/243 were used, two concentrations of the drug atazanavir (1 and 3 μM) and neuroblasts SK-N-BE (2). To evaluate cell viability, the MTT reduction method was used by spectrophotometry and by flow cytometry, the expression of caspase-3 was evaluated by antigen-antibody test, cell death by annexin/propidium iodide by flow cytometry, the production of reactive oxygen and nitrogen species by the probes DCF-DA and DAF-2DA, respectively, and cytokines IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF were evaluated by CBA/BD Kit. Our data showed that: 1) infection by the Zika virus reduced the viability of neuroblasts and 1 μM atazanavir partially reversed this toxicity 2) infection with MOI 1 of the Zika virus caused death by necrosis and increased expression of caspase-3, however, incubation of neuroblasts with 1 μM atazanavir reduced this expression; 3) both inhibition and induction of the NF- κB pathway affected the viability of neuroblasts, in the presence or absence of the infection; 4) the inhibition of autophagy caused a reduction in the viability of neuroblasts, the latter being more evident in the presence of the infection; 5) infection by the Zika virus inhibited the production of ROS by neuroblasts, but this was partially reversed by atazanavir; 6) in the presence of the infection 0.1 MOI of the virus reduced the production of RNS and even atazanavir was not able to reverse this reduction; 7) in the presence of 1 MOI of the virus, there was an increase in the production of IL-1, TNF and more expressive of IL-6 and IL-8, while there was a reduction in IL-12p70; 8) the inhibitor of the production of RNS markedly decreased the viability of the cell, while ROS inducers also reduced the viability of neuroblasts. Taken together, the results suggest that atazanavir at a concentration of 1 μM may be a promising

drug in Zika virus infection to protect neuroblasts, contributing to reduce the risk of microcephaly by decreasing the risk of death of neuroblasts during infection in pregnant women. However, it is required the continuity of studies to verify whether the protective action of atazanavir on neuroblasts observed in vitro would persist in pregnant women infected with the Zika virus and in the prevention of fetal malformations.

Keywords: Neuroblast, Zika, atazanavir, RNS, ROS and cytokines

INTRODUÇÃO

1.1 Histórico, epidemiologia e vetor

O vírus Zika foi descrito pela primeira vez no ano de 1947, em Uganda, detectado em macacos *Rhesus* encontrados em uma floresta chamada Zika, de onde originou-se o nome do vírus (Dick, Kitchen & Haddow 1952). O motivo do estudo em tal floresta foi devido à alta incidência de imunidade à febre amarela em macacos da região. Testes de neutralização mostraram que o vírus Zika não tinha relação com o vírus da febre amarela, dengue, tampouco com vírus de encefalomielite de camundongos (Dick, Kitchen & Haddow 1952; WHO 2017).

Em 1948, o vírus também foi isolado do mosquito *Aedes africanus* (Dick 1952). Em 1952 observou-se que alguns pacientes apresentavam anticorpos contra o vírus Zika, que foram isoladas de macacos e mosquitos, chamando a atenção para a possibilidade de infecção em humanos (Smithburn 1952). Porém, durante uma epidemia de icterícia em 1954, Macnamara avaliou três pacientes africanos do sexo masculino, e observou que dois apresentavam danos no fígado, e todos os três pacientes estavam infectados com o vírus Zika, sendo que o autor considerou a doença causada pelo vírus Zika como de gravidade moderada.

Em 2007 houve propagação do vírus pela África e Ásia, ocasionando um grande surto da infecção pelo vírus Zika nas ilhas de Yap. Em 2013-2014 houve alguns surtos em outras ilhas do pacífico como Polinésia Francesa, Ilhas da Páscoa e Ilhas Cook. Em 2015 houve um grande surto no Brasil, com aparecimento de casos de microcefalia quando a infecção ocorria na gestante e síndrome de Guillain-Barré associados ao quadro clínico da infecção pelo vírus Zika. Em 2016 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a doença como uma emergência de saúde pública internacional (WHO 2017).

O surto no Brasil alertou para fato de que a infecção pelo vírus Zika era um problema de saúde pública internacional, visto a grande área do país e possibilidades de propagação. No Brasil, além de já ter endemicamente Dengue e Chikungunya, ambos transmitidos pelo mesmo vetor, propagou-se o vírus Zika também. Os casos de microcefalia descritos no Brasil indicaram a gravidade da doença (Brasil 2016). Em 2018, 6.371 prováveis casos de doença pelo vírus Zika foram notificados no país, os quais 2.616 foram confirmados. A região Sudeste

e Nordeste apresentaram o maior número de casos, seguidos do Centro-Oeste e Norte do país (Brasil 2018).

O vetor mais importante é o *Aedes aegypti* por possuir uma ampla distribuição geográfica em locais tropicais e subtropicais, sua predominância é no Brasil e sudeste da Ásia, mesmo assim ainda é encontrado em regiões dos EUA e da Europa (Kraemer et al. 2015). A fêmea do mosquito é responsável por diversas doenças, como Dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela, mostrando o enorme impacto na saúde pública que o mosquito pode causar. Os mosquitos localizam o hospedeiro através de diversos sensores, como calor, CO₂, odores do corpo, dentre outros. A forma larvária e de pupa acontece na água, podendo ficar dormentes por meses (Mathews, 2019).

1.2 Vírus

O vírus Zika pertence à família *Flaviviridae*, sendo esta família de vírus também responsável por outros agentes de relevância clínica, como Dengue e Febre Amarela. O vírus pode ser transmitido por vetores, que são mosquitos do gênero *Aedes*, transfusão sanguínea ou por contato sexual (Nunes, Carlini, Marinowic et al. 2016).

O vírus Zika é um vírus de ARN fita simples positiva (+), contendo 10.794 kilobases, possui também uma fase de leitura que será clivada por proteases das células do hospedeiro originando a proteína C que se encontra no capsídeo. A glicoproteína E está envolvida na formação da partícula viral, além disso, possui 7 proteínas não estruturais, classificadas como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Kuno & Chang 2007).

A proteína NS1 está relacionada com a replicação e infecção, ela se associa a lipídeos e forma homodímeros na porção intracelular. A interação dessa proteína com os constituintes do sistema imunitário inato ou adaptativo está associada aos mecanismos de evasão do patógeno, assim como com sua patogênese, esse processo acontece pela secreção da partícula lipoprotéica hexamérica (sNS1). Essa partícula pode ligar-se ao complexo C4/C4b e inibir a ativação da via clássica do complemento. Esses dados foram observados nos vírus Dengue e Oeste do Nilo. Entretanto, pelo fato do vírus Zika ser um Flavivírus e possuir estruturas semelhantes, foi sugerido que a NS1 tenha

mecanismos semelhantes no vírus Zika (Avirutnan et al. 2010, Amorim et al. 2014, Shi & Gao 2017). Há algumas diferenças entre a proteína NS1 do vírus Zika quando comparada com a de outros Flavivírus. Entre elas, a diferença no potencial eletrostático, e é sugerido que essas características que diferenciam o vírus Zika de outros Flavivírus possam ter relação com o seu tropismo por neurônios e com a facilidade que o vírus tem de atravessar a barreira hematoencefálica (Akey et al. 2014).

O vírus Zika é extremamente dependente da protease e helicase NS2B/NS3, já que ele usa este complexo para processamento de poliproteínas. Alguns autores sugerem que este possa ser um bom alvo para drogas, aproveitando-se dessa íntima dependência pelo vírus do complexo enzimático (Tian et al. 2016, Shi & Gao 2017).

A proteína NS5 é a maior proteína presente no vírus, sua função está relacionada com a replicação genômica. Ela permite estabilidade do vírus e evasão do sistema imunitário do hospedeiro. Interessantemente, essa proteína pode agir como um antagonista da resposta por interferons do hospedeiro (Kumar et al. 2016). Essa proteína também foi sugerida como um possível alvo para eliminar o vírus, desde que haja cuidados específicos para que ao atuar sobre a N-metiltransferase a droga também não acabe influenciando as ARN N-metiltransferases do hospedeiro (Zhang et al. 2016).

1.3 Imunidade

A resposta inata contra vírus em geral, segue o padrão clássico de defesa antiviral pelos interferons do tipo 1, que são produzidos por células infectadas, ou até mesmo por células dendríticas. Os receptores semelhantes a Toll (TLRs) endossomais reconhecem os ARNs e ADNs virais, e após esse reconhecimento desencadeiam a ativação de receptores citoplasmáticos que irão estimular a produção de fatores de transcrição de interferons, levando a produção dos mesmos (Yan & Chen 2012; Dixit & Kagan 2013). Outro mecanismo da resposta imunitária inata contra vírus é pelas células citotóxicas naturais (Natural Killer - NK). Alguns vírus utilizam como mecanismo de escape das células T citolíticas (CTL) a menor expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe 1. O reconhecimento da molécula do complexo principal de

histocompatibilidade (MHC) da classe 1 alterada pela expressão da partícula viral é que permite que as células NK sejam liberadas de seu estado normal de inibição, levando a morte da célula infectada. Na falta do MHC, o mecanismo citotóxico permanece inibido, não matando a célula infectada pelo vírus (Rouse & Sehrawat 2010; Yan & Chen 2012; Dixit & Kagan 2013).

Já a resposta imunitária adaptativa é mediada por anticorpos e linfócitos T citotóxicos (CTL). Os anticorpos irão impedir a ligação do vírus na célula do hospedeiro. A ligação do anticorpo acontece com os antígenos do capsídeo viral ou com o envelope viral. Essa ligação impede a infecção da célula, bem como a disseminação viral (Rouse & Sehrawat 2010; Yan & Chen 2012).

A resposta mediada por CTLs ocorre pelo processamento de peptídeos virais pela via de processamento do Complexo Principal de Histocompatibilidade do tipo 1 ou pela fagocitose de células infectadas, mas que culminará na apresentação por moléculas de MHC de classe 1 aos linfócitos TCD8+. Os linfócitos TCD4+ auxiliarem orquestram essa resposta pela secreção de citocinas que permitirão a completa maturação dos linfócitos TCD8+ em linfócitos T citolíticos (CTL) (Yan & Chen 2012). O prolongado efeito dos CTLs na resposta antiviral pode desencadear processos inflamatórios prolongados que lesarão os tecidos, levando a imunopatologia do processo (Rouse & Sehrawat 2010).

Já a resposta imunitária específica ao vírus Zika parece ocorrer pelo desencadeamento de resposta pelos linfócitos TCD4+ e TCD8+ para as proteínas do envelope (glicoproteína E) e NS2A. Foi observado também que a resposta pelos linfócitos TCD8+ são imprescindíveis no *clearance* viral nos tecidos nervosos, observada por experimentos que mostraram que camundongos C57/BL6 nocautes para essas células (LTCD8+) apresentaram uma infecção mais agressiva pelo vírus Zika (Elong Ngonu et al. 2017). Entretanto, o excesso de resposta pelas células TCD8+ pode também estar associada com a destruição dos tecidos neurais na infecção pelo vírus Zika, pois o linfócito mata o neurônio infectado pelo vírus.

Outro fator que pode interferir na resposta imunitária, é a infecção prévia pelo vírus Dengue. Foi descrito que há reação cruzada nas respostas de linfócitos T, podendo ser um processo imunopatológico ou protetor, embora este mecanismo ainda não esteja bem esclarecido. O que irá determinar imunopatologia ou proteção nas respostas por linfócitos T será o grau de reação

cruzada, número de linfócitos T funcionais, carga viral e sequência das infecções (Grifoni et al. 2017; Slon Campos, Mongkolsapaya & Sreaton 2018).

O vírus Zika também pode infectar células do sistema imunitário, como o monócito. Dessa forma, o vírus pode chegar a locais considerados imunologicamente privilegiados, como a placenta e a barreira hemato-encefálica, foi também observado que ele pode infectar monócitos CD14+ e CD16+, sendo que o monócito passaria atuar então como um cavalo de Tróia (Michlmayr et al. 2017). O monócito acaba atuando como um disseminador da infecção. Foi observado que alguns Flavivírus, como o Dengue, utilizam o mecanismo de fagocitose de células apoptóticas para este fim. Este mecanismo utiliza duas proteínas (TIM e TAM) pertencentes a famílias de receptores transmembrana envolvidas no englobamento fagocítico dependente de fosfatidilserina (Meertens et al. 2012).

1.4 Patogenia

A infecção pelo vírus Zika geralmente é assintomática, e na maioria dos casos sintomáticos, apresenta sintomas brandos, como febre baixa ou ausente, exantema, prurido, hiperemia conjuntival sem secreção ou prurido e poliartralgia. Entretanto, acometimentos neurológicos como a síndrome de Guillain-Barré e mielite aguda foram observados em pacientes jovens e adultos (Hamel et al. 2015, Mécharles et al. 2016).

Comprometimento neuronal foi demonstrado em seres humanos pelo acompanhamento ultrassonográfico do cérebro de um feto, cuja mãe foi infectada pelo vírus Zika na décima primeira semana de gestação, e mostrou uma grande diminuição do perímetro cefálico do feto, que passou do percentil 47 para o percentil 24 num período de 4 semanas, entre a décima sexta e a vigésima semana de gestação. O exame microscópico post-mortem obtido desse feto mostrou abundante quantidade de neurônios apoptóticos na área do córtex parietal (Driggers et al. 2016), sugerindo um papel para a apoptose no desenvolvimento da microcefalia. Entretanto, os mecanismos fisiopatogênicos que determinam essa imensa destruição tecidual do sistema nervoso não estão ainda esclarecidos.

O acometimento cerebral ocasionado pelo vírus Zika também foi observado ao infectar fetos de camundongos, comparando o tamanho do córtex cerebral de camundongos infectados com os não infectados, os autores observaram que o córtex do grupo infectado estava significativamente menor do que o do grupo controle, mostrando o tropismo do vírus para este determinado tecido e para células neurais ainda em desenvolvimento (Nguyen et al. 2016). Interessantemente, após a entrada do vírus pela barreira hemato-encefálica, notou-se que astrócitos e a retina também estavam infectados pelo vírus Zika, quando observado em camundongos (Van Den Pol et al. 2017).

Os neurônios já desenvolvidos possuem uma certa resistência ao vírus; experimentações *in vitro* mostraram que o vírus Zika possui tropismo para os neurônios ainda em desenvolvimento, entretanto, apesar de certa resistência, isso não impede totalmente a infecção de neurônios desenvolvidos, corroborando com as características clínicas apresentadas, pois embora a maioria dos pacientes é assintomática, podem ocorrer formas mais graves com comprometimento neurológico, como a mielite e a síndrome de Guillain-Barré (Hughes et al. 2016, Gorshkov et al. 2019).

Em humanos, foi observado que o vírus Zika utiliza, como mecanismo de escape da resposta imune, a proteína NS5 para antagonizar a resposta protetora pelo interferon do tipo 1, levando a quebra do STAT2 que é uma molécula sinalizadora para receptores associados a essas respostas (Miner & Diamond 2017). O vírus persiste em alguns fluídos corporais por meses, sendo que no sêmen pôde ser observado até 6 meses após o aparente *clearance* viral (Baud et al. 2017, Huits et al. 2017).

1.5 Citocinas

As citocinas pertencem a um grande grupo de proteínas que são secretadas ou permanecem ligadas à membrana celular, agem como mediadores na comunicação entre as células e possuem muitas estruturas e funções, dentre elas, regular e coordenar as atividades do sistema imunitário. As células do sistema imunitário secretam muitas citocinas e também expressam seus receptores específicos que irão sinalizar para as diversas funções dessas proteínas (Ramani et al. 2015). As células do sistema nervoso central e periférico

também são capazes de produzir citocinas e seus receptores e essas citocinas são muito importantes na neuromodulação (Szelényi, 2001). As citocinas contribuem para diversas funções no sistema nervoso central, como reparo tecidual e atividade sináptica (Pugazhenthil et al. 2013) e podem modular ação, diferenciação e sobrevivência de células neuronais (Szelényi, 2001). A comunicação entre o sistema nervoso e o sistema imune é bidirecional e muitas das moléculas utilizadas nessa comunicação são as citocinas. E as citocinas podem atuar de modo autócrino, parácrino ou endócrino (Szelényi, 2001).

O fator de necrose tumoral (FNT) medeia a resposta inflamatória aguda a microrganismos infecciosos. Ele é produzido por macrófagos, células dendríticas, micróglia e outros tipos celulares. Seus efeitos pró-inflamatórios estão caracterizados pela adesão entre leucócitos e células endoteliais, indução do óxido nítrico sintase, e funciona como uma citocina de fase aguda, sendo uma das primeiras a induzir efeitos de cascata em boa parte das infecções (Wong et al. 2011). O FNT- α está aumentado em pacientes infectados com o vírus Zika, sendo provavelmente devido ao processo agudo da infecção. Foi também observado que em um paciente infectado com vírus Zika que desenvolveu fibrilação atrial, que os níveis séricos dessa citocina estavam aumentados em comparação com outros pacientes infectados com vírus Zika, mas que não apresentavam fibrilação atrial (Abdalla et al. 2018).

O FNT está associado com a excitabilidade neuronal; foi observado em culturas de neurônios hipocámpais que a citocina aumenta a corrente de cálcio nas células, e o aumento dessa citocina no cérebro também está associado ao aumento de convulsões (Galic, 2012).

Os neurônios expressam receptores para o FNT, mas não está bem esclarecido se eles produzem a citocina (Szelényi, 2001), também não está esclarecido o papel do vírus Zika na produção do FNT pelas células cerebrais.

A IL-1 β é outra citocina inflamatória e exerce um papel tanto na ativação da inflamação quanto na coagulação, sendo que seus níveis estão aumentados em pacientes com a síndrome do choque do Dengue, e foi observado que a sua presença induz a fibrinólise, podendo piorar o prognóstico em pacientes com infecção pelo vírus Dengue (Suharti et al. 2002). Foi questionado se, por também ser uma infecção causada por um Flavivírus, os níveis dessa citocina estariam aumentados na presença da infecção pelo vírus Zika.

Interessantemente, observou-se que os seus níveis estavam relacionados positivamente com a carga viral em pacientes infectados pelo vírus Zika (Terzian et al. 2017). Seus níveis elevados também estão associados a falha e disfunção de órgãos em infecções graves (Bozza et al. 2007).

IL-1, regula a secreção de glutamato, importante neurotransmissor. Além disso, a IL-1 β pode atuar como um potente regulador do gene transportador de serotonina (Zhu et al, 2006). É também observada uma dicotomia na ação da citocina dependendo de sua concentração, visto que, em dosagens baixas liberadas no curso de uma infecção, estão associadas com letargia, enquanto altos níveis estão associados com o aumento da excitabilidade neuronal (Galic, 2012). A IL-1 β é produzida pelos neurônios, que também apresentam receptores para essa citocina (Szelényi, 2001).

Outra importante citocina envolvida em respostas inflamatórias é a IL-6, que pode ter efeito tanto local quanto sistêmico. Sua ação no fígado irá induzir a produção de mediadores inflamatórios, estimulando a produção de neutrófilos, além de uma mudança para o ramo Th17 dos linfócitos T CD4+ (Tanaka, Narazaki & Kishimoto 2016). Assim como a IL-1 β , a IL-6 também tem papel na ativação da inflamação e da coagulação. Foi observado em pacientes, que os seus níveis estão aumentados na fase aguda da infecção pelo vírus Zika, permanecendo relativamente alta ainda na fase de recuperação (Tappe et al. 2016). A IL-6 pode ser secretada por células do sistema imune e por células que não pertencem a este sistema, como os neurônios e astrócitos (Märs et al, 1998). Os neurônios tanto produzem a citocina como também apresentam receptores para essa citocina (Szelényi, 2001). Tem sido mostrado que a IL-6 atua como um fator neurotrófico, é importante na diferenciação dos oligodendrócitos e na regeneração de nervos periféricos (Rothaug, 2016).

Existem duas vias de ativação da célula pela IL-6; uma via que ocorre pela ligação da IL-6 diretamente ao seu receptor na superfície da célula, que é chamada sinalização clássica e pela a trans-sinalização, que é mediada pela ligação do receptor solúvel da IL-6 (IL-6rs) que se liga à própria IL-6 e esse conjunto medeia a ligação à molécula gp130 na superfície da célula, e induz a sinalização celular, sendo que a maioria das células expressam a gp130. O receptor da IL-6 é cortado pela molécula ADAM 10 e 17 e eliminado como receptor solúvel. A ativação da célula pela trans-sinalização está associada

com neurodegeneração, e a via clássica está relacionada com a regeneração do tecido neuronal (Rothaug, 2016).

A ação da IL-8 está principalmente envolvida na quimiotaxia de neutrófilos. A produção da IL-8 pode ser induzida tanto pelo FNT- α quanto pela IL-1 β em células endoteliais, células do sistema imunitário e células epiteliais. (Wong et al. 2011). O seu papel na infecção pelo vírus Zika está associado à sua produção excessiva, associada às duas citocinas inflamatórias FNT- α e IL-1 β , determinando desordens neurológicas nos pacientes (Beaver et al. 2018). Ela também tem sido considerada um marcador de mal prognóstico, e também, está extremamente elevada em grávidas cujos fetos apresentavam alguma anormalidade decorrente da infecção pelo vírus Zika (Kam et al. 2017).

A IL-8 pode também ser produzida por neurônios e astrócitos, quando há um estímulo pró-inflamatório, particularmente pelo FNT e IL-1, por aumento das concentrações citosólicas de Ca²⁺, ou pela resposta ao Fas ligante. Suas concentrações aumentam consideravelmente no cérebro, sendo inclusive frequentemente presente em gliomas (Brat et al, 2005).

A IL-12 é outra citocina que compõe o ramo de citocinas pró-inflamatórias, sua ação estimula a produção de INF- γ , e aumenta a citotoxicidade pelas células NK e linfócitos T citolíticos, promovendo também a diferenciação para o ramo Th1. Sua composição é de um heterodímero com as subunidades, 35 kD (p35) e 40 kD (p40) (Beadling & Slifka 2006). Ela será produzida em resposta à ligação ao TLR ou outros receptores de reconhecimento de padrão, estes induzidos por estímulos como ácido lipoteicoico, lipopolissacáride (LPS) e infecções virais (Podlaski et al. 1992).

A IL-12 possui uma importância central na resposta a patógenos intracelulares, foi mostrado em camundongos que a deficiência desta citocina ou de seu receptor leva a uma resposta imunitária mediada por células deficiente e uma maior susceptibilidade a infecções (Gee et al. 2009). Foi observado em pacientes infectados pelo vírus Zika, que os níveis séricos desta citocina não tiveram alterações significativas na fase aguda e na convalescente (Tappe et al. 2016). Entretanto, observou-se sua presença em micróglia infectadas pelo vírus Zika, indicando neuroinflamação (Lum et al. 2017). Foi observado em um estudo conduzido por Hikawa e cols (2004) que os neurônios podem controlar a resposta imune mediada por células pela secreção de IL-12.

A IL-10 atua como um regulador da resposta imunitária, ela inibe macrófagos ativados e células dendríticas, mantendo o controle da resposta imune inata e mediada por células. A ligação ao receptor da IL-10 ativa a via da STAT3, em consequência da associação das Janus quinases (JAK1 e TYK2). Foi observado tanto em camundongos quanto em humanos que mutações no gene da IL-10, que não ativam corretamente o STAT3, causam diversas patologias autoinflamatórias, infiltração e dano tecidual (Schmetterer & Pickl 2017). Ela pode inibir também a atividade de citocinas inflamatórias como o FNT- α , IL-1 β e IL-8. Sua atividade na infecção pelo vírus Zika foi observada em pacientes que apresentaram níveis elevados dessa citocina na fase febril da doença, semelhante ao que é observado na infecção por Dengue. Entretanto, também tem sido sugerido que altos níveis dessa citocina na infecção pelo vírus Zika está associada a ausência de desordens neurológicas (Tappe et al. 2016; Terzian et al. 2017; Kam et al. 2017; Beaver et al. 2018).

Os neurônios produzem e apresentam receptores para a IL-10. Esta citocina é também encontrada em astrócitos, micróglia e oligodendrócitos, sua principal função quando encontra-se em torno dos neurônios é a proteção contra a neurodegeneração, causada por níveis altos de glutamato, ou por excesso de inflamação (Zhou et al, 2009). Ela pode agir pela via do NF- κ B modulando a resposta da célula e evitando a apoptose.

1.6 Via do NF- κ B

O fator de transcrição NF- κ B desempenha um papel fundamental na ativação de linfócitos, inflamação e sobrevivência de células. Ele pode ser ativado por vários fatores, entre eles, por diversas citocinas ou por receptores semelhantes ao Toll (TLRs) e possui papel crucial nas respostas imunitárias, tanto inata quanto adaptativa. Todas as proteínas da via do NF- κ B possuem um domínio comum chamado de domínio de homologia Rel, que é o domínio de ligação ao ADN. Para que este fator de transcrição possa ativar a expressão de genes no ADN, ele precisa ligar-se ao ADN, no local que contém um domínio de ativação, que se liga ao Rel (Napetschnig & Wu 2013). Das 5 proteínas que compõem o NF- κ B, 3 possuem os domínios Rel e domínios de ativação, são elas p65/RelA, RelB, e c-Rel. As outras duas proteínas NF- κ B1/p50 e NF- κ B2/p52,

possuem o domínio Rel, mas sem o domínio de ativação. A p50 ao ligar-se com o RelA ou o c-rel, forma heterodímeros ativos, considerados canônicos. Eles localizam-se no citoplasma ligados a um inibidor do NF- κ B, o I κ B α . Essa via só será ativada através de receptores de sinalização, os quais, direcionarão a resposta induzida para a inflamação ou ativação de linfócitos (Perkins 2007).

Ao ocorrer a sinalização, a ubiquitina ligase E3 irá adicionar a proteína NEMO ou IKK γ uma cadeia de ubiquitina. A NEMO pertence a um complexo enzimático chamado cinase I κ B ou IKK, este complexo possui duas subunidades IKK α e IKK β , ambas com o potencial de serem cinases ativas. Ao ser poliubiquitinada, a I κ B α , será degradada no proteossoma e então o NF- κ B será liberado para entrar no núcleo (Mitchell, Vargas & Hoffmann 2016).

O FNT possui diversos receptores, denominados TRAFs, e estes podem ativar a via canônica do NF- κ B.

A via de sinalização do NF- κ B, possui também outra via de ativação, denominado não canônico. A p52 em conjunto com o RelB ao serem ativados, participam da formação de órgãos linfoides e também da sobrevivência de linfócitos B imaturos. Os receptores envolvidos na ativação dessa segunda via são o LT β R (receptor de linfotoxina β) e o BAFFR (Receptor BAFF), isso irá ativar o complexo enzimático IKK, levando à ubiquitinação e degradação do dímero NF- κ B-RelB, liberando sua forma ativa (Perkins 2007; Mitchell, Vargas & Hoffmann 2016).

A ação do vírus Zika nessa via, foi sugerida em um estudo envolvendo células humanas (monócitos) e de camundongos. Observou-se que o reconhecimento do genoma viral ativou o complexo IKK, levando a ubiquitinação e clivagem do complexo NF- κ B e I κ B α , ativando assim o NF- κ B e levando a produção da pro-IL-1 β . A proteína viral NS5 se ligou ao NLRP3, ativando o inflamassoma, e posteriormente clivou a pro-IL-1 β , levando a secreção de IL-1 β , induzindo assim a inflamação no hospedeiro (Wang et al. 2018).

1.7 Radicais de Oxigênio

Os radicais de oxigênio são naturalmente produzidos pelo organismo, seja pelo metabolismo das mitocôndrias, ou pelos macrófagos e neutrófilos e convertem o oxigênio em espécies reativas de oxigênio (EROs), esse sistema é

ativado pela enzima chamada fagócito oxidase, e esta enzima pode ser ativada pelos TLRs, IFN- γ e outros estímulos, e ela reduz o oxigênio em EROs (Cruvinel et al. 2010). Esta enzima também pode agir como uma bomba de elétrons, gerando um movimento de íons para o vacúolo fagocítico, pela criação de um gradiente eletroquímico na membrana do vacúolo, de forma que o pH será aumentado e ativará enzimas como a elastase (Murray & Wynn 2011).

Foi observado que o *Aedes aegypti* ao se alimentar ativa uma resposta oxidante no seu intestino, similar ao EROs. Foi mostrado que essa resposta no mosquito foi benéfica para o vírus Dengue, aumentando sua prevalência, entretanto, foi neutra para o vírus Zika (Oliveira et al. 2017). O estresse oxidativo é importante também na patogenia determinada pela infecção pelo vírus Zika. Foi observado em camundongos que o estresse oxidativo leva a lesão testicular, e pode ser amenizado pelo tratamento dos animais com Ebselen, que é uma droga antioxidante (Simanjuntak et al. 2018). Tem sido observado que o aumento do peróxido de hidrogênio determinada por infecção viral pode levar a morte celular por mecanismo independente das caspases (Figura 1).

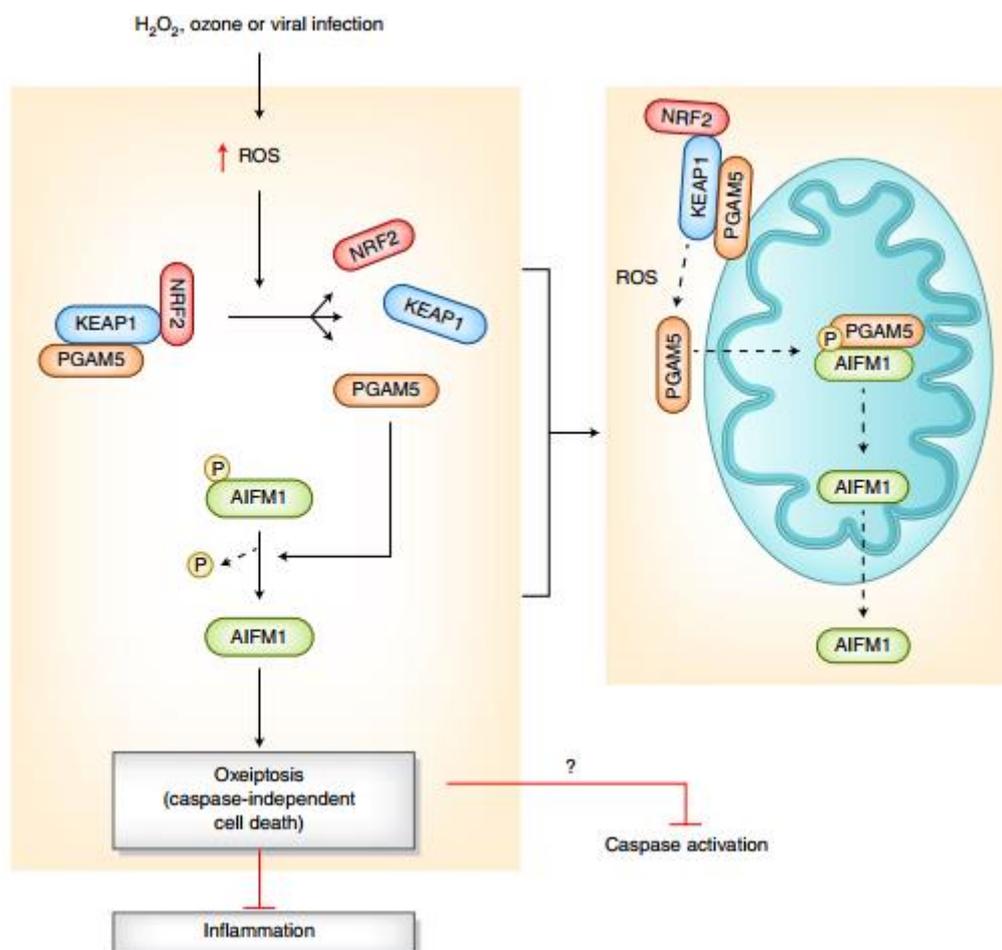


Figura 1: Atividade viral na célula e princípio de oxiptose. Fonte: Kesavardhana & Kanneganti (2018).

Pela sua íntima relação com a inflamação e dano celular, acreditava-se que as EROs não teriam uma relação positiva com o crescimento e desenvolvimento neuronal (Oswald et al. 2018). Entretanto, observou-se que as EROs estavam associadas com a ativação da via de sinalização JNK/AP-1, que está relacionada a função neuronal (Milton & Sweeney, 2012). Foi observado que o H_2O_2 é necessário para a indução de fatores de crescimento dos terminais sinápticos (Oswald et al. 2018). Então, sugere-se que as EROs agem como mensageiros secundários na regulação do desenvolvimento neuronal.

1.8 Óxido Nítrico

Pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), os macrófagos podem produzir espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO). Essa enzima irá catalisar a conversão de arginina em citrulina, sendo assim, o gás NO

será liberado. O NO pode ser combinado ao ânion superóxido, dentro dos fagolisossomas, formando peroxinitritos para então eliminar os microrganismos (Murray & Wynn 2011).

Algumas mutações na porção Fc dos anticorpos foram estudadas para avaliar uma possível melhoria na resposta excessiva no Dengue e Zika. Interessantemente, observou-se que uma mutação na porção Fc da IgG irá suprimir a resposta exagerada de anticorpos, porém, irá diminuir as respostas pelo NO, gerando assim uma resposta ineficiente aos vírus (Munjal et al. 2017).

Em níveis fisiológicos, a produção de NO é importante para o desenvolvimento, maturação neuronal e plasticidade (Tricoire & Vitalis, 2012). O NO irá ativar a guanilil ciclase, responsável pela conversão do GTP em cGMP, consequentemente a ativação da proteína cinase G, isso irá ativar diversos subfatores que em consequência da ativação da via NO/cGMP irá induzir o desenvolvimento neuronal, modulação sináptica, memória e aprendizado (Gallo & Iadecola, 2011). Entretanto, o aumento exacerbado do NO desencadeará estresse celular, levando a inflamação e consequentemente eventual perda da célula.

1.9 Antirretrovirais

O uso de antirretrovirais como o atazanavir (ATZ) marcaram a mudança na infecção pelo VIH, considerada uma das doenças mais devastadoras da década de 80/90, que até então era conhecida como uma patologia de morte certa (Braun et al. 2014). O ATZ é um inibidor de protease do VIH. Inibindo seletivamente o processamento específico pelo vírus das proteínas virais Gag-Pol nas células infectadas, impedindo em consequência, a formação de vírus maduros e a infecção de novas células (Pillero, 2004).

O vírus Zika mostrou-se susceptível a droga ribavirina, usada no tratamento para Hepatite C, sugerindo que drogas que inibem as ARN polimerases virais podem ter potencial para impedir a proliferação do vírus e

inibir conseqüentemente a infecção, porém, drogas como a ribavirina não podem ser usadas por gestantes (Kamiyama et al. 2017).

O possível uso de antirretrovirais já utilizados no mercado como o ATZ, poderia facilitar o tratamento contra a infecção pelo vírus Zika, pois são drogas já utilizadas em mulheres gestantes (Hirschel et al. 2017). Ademais, já foi observado que essas drogas modulam a via do NFκB (Alves et al. 2015), podendo potencialmente modificar a evolução da infecção pelo vírus Zika (Figura 2).

Foi observado que a combinação medicamentosa lopinavir/ritonavir pode inibir a interação das proteases do vírus Zika NS2B-NS3, sendo assim, o atazanavir que também é um inibidor de protease com atividades semelhantes ao lopinavir pode ter efeitos similares (Yuan et al. 2017). A combinação lopinavir/ritonavir está associada a indução de resistência a insulina, enquanto o atazanavir não apresentou este efeito (Noor et al. 2006).

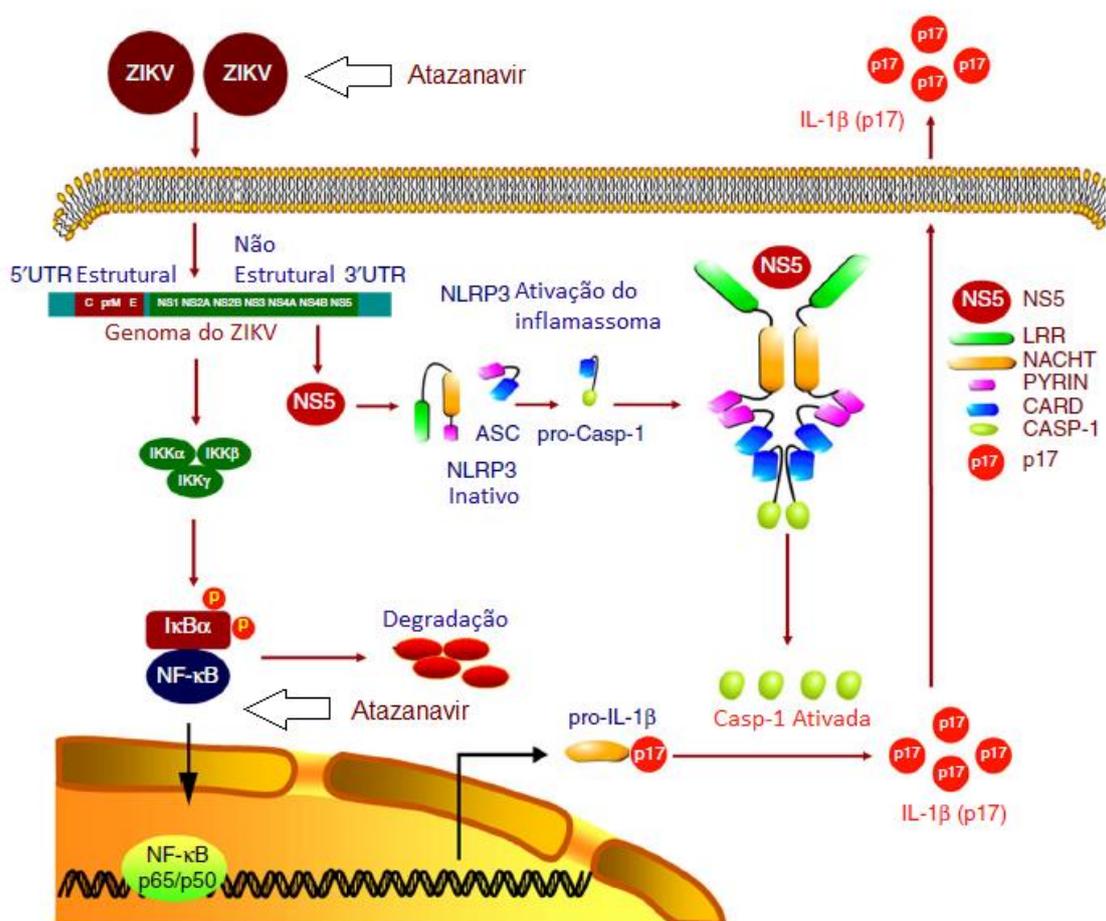


Figura 2: Efeito sugerido dos antirretrovirais no vírus Zika e na atividade inflamatória. Adaptado de Wang et al. 2018; Alves et al. 2015; Yuan et al. 2017.

1.10 Morte Celular Neuronal

A apoptose é um tipo de morte celular programada, acontecendo naturalmente no organismo. Não há extravasamento do conteúdo intracelular, ocorrerá redução de tamanho, condensação do cromossomo e fragmentação do ADN (Toné et al. 2007). Ocorrem sinais que induzem a atividade apoptótica na célula, sejam eles intrínsecos ou extrínsecos. Alguns dos estímulos internos são caracterizados pela ativação da p53 e aumento de fatores apoptóticos advindos da classe da Bcl-2 (Roos & Kaina, 2006). O estímulo externo pode acontecer por meio de células do sistema imunitário que induzem a apoptose, como a interação Fas/FasL. Seja pela via intrínseca ou extrínseca, ocorrerá mudanças na permeabilidade mitocondrial, isso liberará fatores apoptóticos, como o citocromo C, que irá induzir a ativação das caspases, como por exemplo a caspase-3, tendo como papel a clivagem de diversos tipos de substratos proteicos (Tiwari et al. 2011).

A necrose é outro tipo de morte celular, em que diferentemente da apoptose, há aumento do tamanho da célula e extravasamento do conteúdo celular. Os estímulos que induzem uma necrose podem ser diversos, sendo eles: agentes infecciosos, hipóxia, radiação e ativação do complexo RIP1-RIP3-MLKL (Caccamo et al. 2017; Adigun et al. 2020). Diferentemente do que ocorre na apoptose, a necrose é caracterizada por ativação do sistema imunitário e indução de fatores inflamatórios, podendo levar a uma perda extensiva do tecido acometido.

A morte celular em neurônios é um fenômeno relativamente natural e está associada com a neurogênese, desde que a morte de neurônios seja acompanhada pela formação e maturação de novos neurônios, e que essa morte não esteja relacionada com processos patológicos (Chi et al. 2018). Os neurônios são células caracteristicamente resistentes ao estresse e fatores que induzam apoptose; quanto mais maduros estejam os neurônios mais resistentes serão. Interessantemente, em um experimento realizado em ratos os autores observaram que quanto mais maduro fosse o neurônio melhor seria a recuperação de uma axotomia (Snider et al. 1992; Kole et al. 2013).

JUSTIFICATIVA

O surto de infecção pelo vírus Zika no Brasil foi alarmante, com muitos casos de microcefalia ocasionados pela infecção pelo vírus Zika em gestantes (Brasil 2016). O Zika é um vírus relativamente novo (descoberto em 1947) e apesar de ter sido descrito como uma infecção de gravidade moderada, pode apresentar formas graves, como a microcefalia. O vírus possui tropismo por neurônios, principalmente os que ainda estão em formação, porém, isso não descarta o risco de infecção em neurônios maduros, conseqüentemente necessitamos de investigações de possíveis novas drogas para o seu controle. A investigação de medicamento com potencial antiviral e que já é utilizado no tratamento para outros vírus ARN, como o atazanavir, e que já é utilizado na prática clínica em mulheres gestantes, poderia favorecer principalmente as mulheres grávidas, já que essa droga não oferece risco a saúde da criança.

A provável interferência do vírus Zika nas vias inflamatórias intracelulares, pode modificar as vias de ativação, levando ao excesso de resposta inflamatória, conseqüentemente estressando as células, e interferindo no processo de replicação viral. A investigação da atuação do vírus Zika e do atazanavir em neuroblastos poderia elucidar as vias de lesão da célula ocasionada pela infecção e se o atazanavir poderia ter alguma ação protetora neuronal, o que poderia prevenir casos de microcefalia ocasionados pelo vírus Zika.

Foi observado que o atazanavir apresenta efeito contra o vírus Zika (Yuan et al. 2017), entretanto, pouco se sabe por quais mecanismos o vírus Zika poderia exercer a toxicidade observada para os neuroblastos e se o atazanavir poderia proteger contra a lesão neuronal ocasionada pelo vírus. A elucidação destes fatores pode contribuir para esclarecer os mecanismos de lesão neuronal pelo vírus Zika e a se há indícios que o atazanavir poderia contribuir para diminuir a lesão por esse Flavivírus.

OBJETIVO

- **Geral**

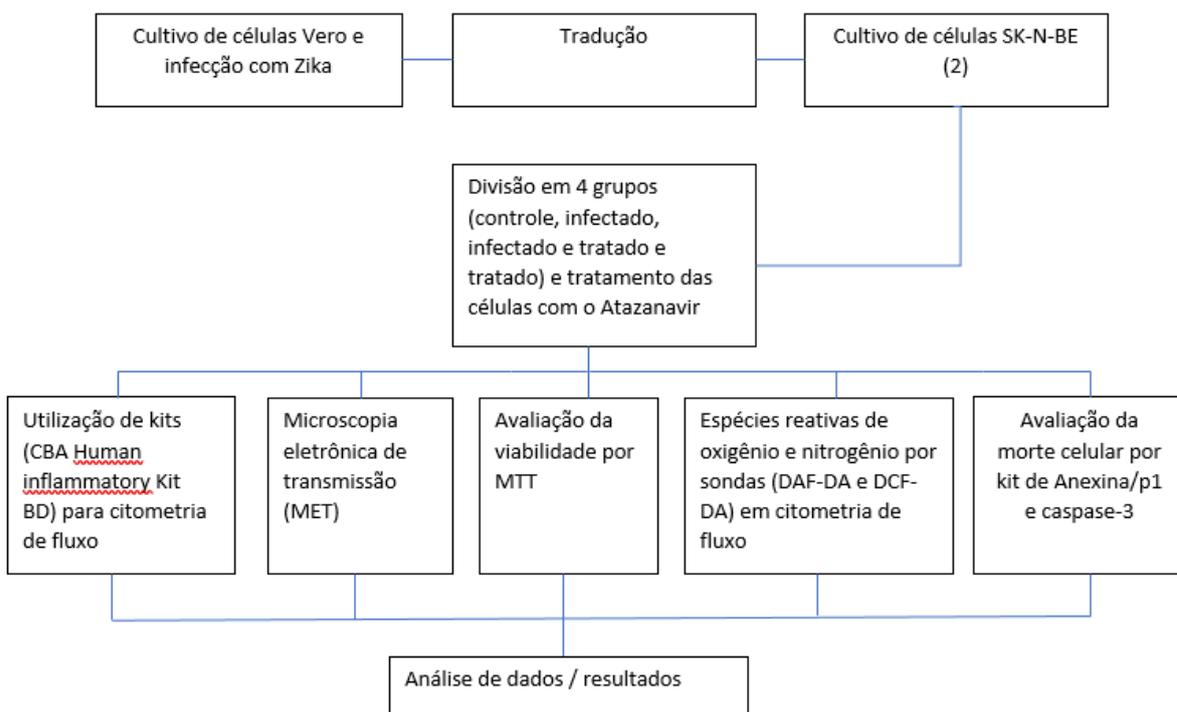
O objetivo do presente projeto é avaliar os mecanismos de lesão neuronal pelo vírus Zika e a influência do medicamento atazanavir nas vias inflamatórias em neuroblastos humanos de linhagem imortalizada infectados ou não pelo vírus Zika.

- **Específico**

1. Esclarecer os mecanismos de toxicidade neuronal pelo vírus Zika e se o atazanavir modifica a viabilidade de neuroblastos durante a infecção com o vírus Zika.
2. Avaliar a influência da infecção com o vírus Zika na produção de radicais de oxigênio e nitrogênio e verificar se o tratamento das células com atazanavir modifica essa resposta.
3. Avaliar a influência da infecção com o vírus Zika na produção de das citocinas inflamatórias pelos neuroblastos e verificar se o tratamento das células com atazanavir modifica essa resposta.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental



4.2 Neuroblasto SK-N-BE (2)

A célula de linhagem de neuroblastoma SK-N-BE (2), foi coletada em 1972 de uma biópsia de medula óssea de uma criança com neuroblastoma disseminado após repetidas sessões de radioterapia e quimioterapia. A morfologia das células varia, sendo algumas com longos processos e outras com formatos epitelioides (Figura 3).

Os neuroblastos foram cultivados em uma mistura de dois meios, seguindo a proporção de 1:1, Eagle's Minimum Modified Medium (EMEM) (ATCC) + DMEM F12 (ATCC) e suplementados com 10% de soro fetal bovino.

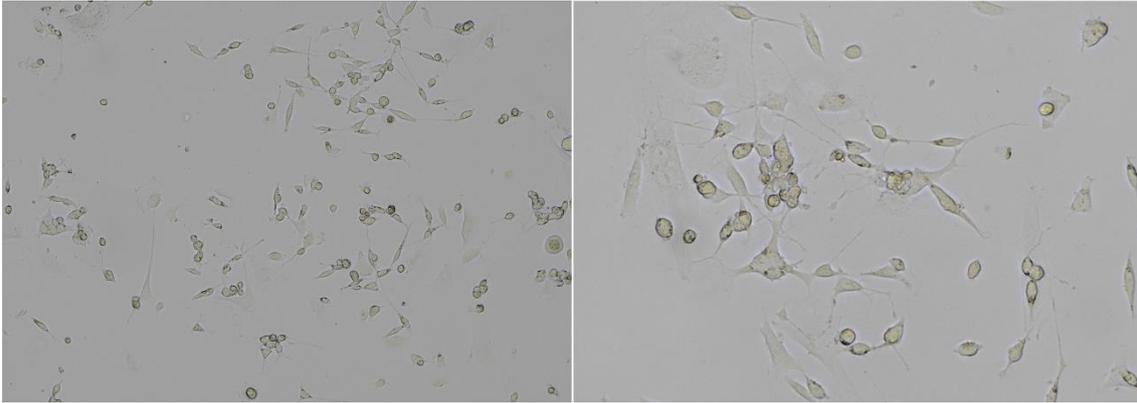


Figura 3: Neuroblastos SK-N-BE (2), à esquerda aumento de 20x, à direita aumento de 40x. Cultura à fresco. Fotos capturadas pelo microscópio Nikon Eclipse Ts2.

4.3 Células Vero

Células Vero são comumente utilizadas em ensaios virais para a titulação devido a sua alta susceptibilidade a diversas cepas virais. É uma célula aderente e com formato epitelial. Foi iniciado seu cultivo em células de Rim de um Macaco Verde Africano pelos pesquisados Yasumura e Kawakita em Chiba, Japão.

4.4 Células C6/36

Linhagem celular originária de mosquito *Aedes albopictus*, provenientes do banco de materiais biológicos da Renê Rachou - FIOCRUZ, MG, gentilmente cedidos pelo pesquisador Dr. Alexandre Vieira Machado. As células foram mantidas em cultivo, e foram utilizadas quando alcançou a confluência de 70-80% para replicação viral por 6 dias. O meio de cultura utilizado para crescimento dessas células foi o Leibovitz's L-15 Medium (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 10 ml de penicilina/estreptomicina (Gibco), com pH 7,6, em estufa a 28°C.

4.5 Vírus Zika

O isolado do vírus (ZIKV PE 243) utilizado, foi doada pelo pesquisador Dr. Alexandre Vieira Machado, do Instituto Renê Rachou-FIOCRUZ- MG. A multiplicação do vírus foi feita nas células C6/36, por 6 dias. A cultura foi

centrifugada e do sobrenadante foram feitas alíquotas de 100 µl, que foram congeladas em freezer -80°. Duas dessas alíquotas foram tituladas.

4.6 Cultivo de células e preparo para a titulação

As células C6/36 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, St.Louis, MO, USA), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de gentamicina (Gibco), 1% de aminoácidos não-essenciais (Sigma), 1% de NCTC-109 (Sigma) e 1% de bicarbonato de sódio, mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

As células C6/36 foram cultivadas até que o frasco de cultura estivesse preenchido com uma monocamada de células de em torno 95%, após isso, as células então foram infectadas pelo vírus Zika. (Contreras & Arumugaswami 2016).

4.7 Titulação Viral

Foi realizada uma adaptação do protocolo descrito por Baer & Kehn-Hall (2014). Foram utilizadas células C6/36 para manter o cultivo do vírus Zika. Para a titulação foram utilizadas células Vero. Foram realizadas duas passagens do vírus Zika em células Vero para então realizar a titulação. Para a titulação, foram utilizadas placas de 6 poços (KASVI), em cada poço foram distribuídas $1,5 \times 10^5$ de células Vero, que estavam em condições descritas no item 4.5, em seguida levadas para a estufa a 37 °C e deixadas para aderência por 24 horas. Em seguida, diluições seriadas do vírus foram preparadas em meio DMEM (Sigma), em triplicatas de 200 µL. Após retirar as células da estufa a 37°C com 5% de CO₂, foi retirado o meio e acrescentado 200 µL das diluições seriadas do vírus Zika e incubados por mais 1 hora em estufa 37°C com 5% de CO₂ e agitadas levemente de 15 em 15 minutos. Após isso, foi acrescentado o meio semissólido (CMC – Carboximetilcelulose a 1,5% + DMEM [Sigma]) e então a placa foi incubada por 6 dias em estufa 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, o meio semissólido foi retirado da placa e acrescentado o fixador (formaldeído a 10% [Sigma]) por 1 hora. Após a fixação, foi feita a coloração com cristal de violeta 1% por 15 min. Em seguida as placas foram lavadas em água e permitido a

secagem em estufa. Após secar, as placas presentes na confluência das células Vero formadas pela ação viral (Figura 4) foram contadas para determinar a titulação viral conforme o cálculo:

$$\text{Título} = P \times F \times 10 \times (\text{PFU/mL})$$

P: Média do número de placas obtido na diluição em que se contou as placas

F: Fator de correção para expressar o título de PFU/mL (1000 μ L / volume do inóculo).

10: Diluição em que as placas foram contadas.

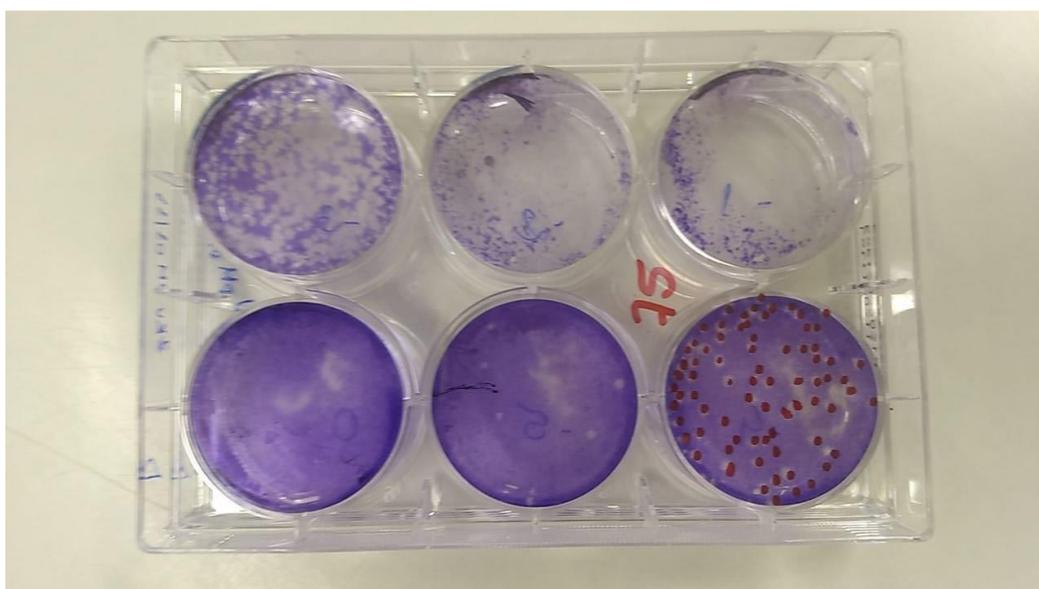


Figura 4: Placa de titulação. Cada poço representa uma diluição do vírus Zika, cada ponto em vermelho observado no poço representa uma formação de placa viral que é representada no cálculo do tópico 4.7.

4.8 Infecção dos neuroblastos

Para a infecção dos neuroblastos, foram separadas placas de 24 poços estéreis, e cada em cada poço foi colocado 1×10^5 de células (SK-N-BE (2)) junto com o meio característico da célula descrito no item 4.5, em seguida as células foram infectadas com o vírus Zika, com MOI (multiplicidade de infecção) de 0.1 e 1, para então dar início aos experimentos. O MOI é o índice que indica o número de vírions colocado por cada célula. Então, o MOI de 1 indica que foi

colocado 1 vírion para cada célula presente na determinada amostra, mas não necessariamente indica que somente 1 vírion irá infectar uma célula.

4.9 Microscopia eletrônica de transmissão

Foram separados 1×10^7 neuroblastos para a microscopia de transmissão, seguiram os mesmos procedimentos de cultivo e infecção descritos acima, sendo utilizado apenas 1 de MOI. Após adsorção do vírus por 1 hora, as células ficaram expostas ao total de 3 horas ao vírus, então foram retiradas da garrafa de cultura e centrifugadas a 700 rpm por 5 minutos para obtenção do pellet para a microscopia. A amostra foi fixada com fixador Karnovsky (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose, 5mM de CaCl_2 em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2) por 24 horas e em seguida, lavada 2x com tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 (15 minutos cada etapa). No momento da pós-fixação a amostra passou uma hora em tubo de 1,5 mL com tetróxido de ósmio + ferricianeto de potássio, na concentração 1:1. Posteriormente, o material foi lavado com água destilada, por duas vezes e após isso seguiu a etapa de desidratação com gradientes de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100%), por 8 minutos em cada uma das etapas. A etapa subsequente é a de infiltração gradual de resina Spurr, substituindo a acetona na proporção seguindo respectivamente, 2:1 (6 horas ou overnight), 1:1 (6 horas), 1:2 (6 horas ou overnight) e resina pura por até 6 horas. No momento de emblocar o material, foi preciso deixá-lo em resina pura, em tubo de 1,5 mL, na estufa a 65°C por 48 horas. Por fim, realizou-se os cortes semifinos, com 5 μm de espessura e cora-se o material com azul de toluidina para escolha das regiões de interesse. Depois de cortes ultrafinos de 50 nm, com ultramicrótomo EM UC7 (Leica, Alemanha) colocou-se sobre telas de cobre de 300 *mesh*, os quais foram contrastados com acetato de uranila a 3% por 10 minutos. O Material foi observado em microscopia eletrônica de transmissão (MET) em microscópio Jeol 1011 (Jeol, Japão).

4.10 Determinação de óxido nítrico

Foram incubados 1×10^5 neuroblastos por poço em placa de 96 poços, infectadas ou não com o vírus Zika (MOI 0,1 e 1). As células foram tratadas ou

não com atazanavir na concentração de 1 e 3 μM (Yuan et al. 2017), como controle positivo foi utilizado 10 ng/ml de lipopolissacáride (LPS). As células foram incubadas por 24 horas em câmara úmida a 37°C em 5% de CO_2 . Em seguida foram incubados por 30 minutos com a sonda de 2-diacetato diaminofluoresceína (DAF-2DA), sendo clivados e formando 3,4-diaminofluoresceína (DAF-2). O DAF-2 é retido na célula e reage com o NO na presença de oxigênio, gerando triazolodiaminofluoresceína (DAF-2T), um composto altamente fluorescente. A análise foi realizada no citômetro de fluxo BD LRS FORTESSA, e o refinamento dos dados obtidos por software FlowJo, seguido de análise estatística pelo software Graphpad Prism 8 (GraphPad Software – San Diego, EUA).

4.11 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio

Foram incubados 1×10^5 neuroblastos por poço em placa de 96 poços, infectadas ou não com o vírus Zika (MOI 0,1 e 1). As células foram tratadas ou não com atazanavir na concentração de 1 e 3 μM (Yuan et al. 2017), com controle positivo utilizando 20 nM Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA). As células foram incubadas por 24 horas em câmara úmida a 37°C em 5% de CO_2 e, em seguida, foram incubadas por 1 hora com a sonda 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA, que é permeável à membrana celular e não fluorescente), para avaliação da produção de peróxido de hidrogênio por citometria de fluxo. Na presença de ROS, este composto é oxidado no interior da célula e produz um composto fluorescente, 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), que permanece intracelular (Eruslanov & Kusmartsev 2010). A análise foi realizada no citômetro de fluxo BD LRS FORTESSA, e o refinamento dos dados obtidos por software FlowJo, seguido de análise estatística pelo software Graphpad Prism 8 (GraphPad Software – San Diego, EUA).

4.12 Determinação das citocinas

As citocinas foram determinadas por citometria de fluxo no sobrenadante das culturas de neuroblastos e quantificadas, utilizando kit comercializado. Foram quantificadas as citocinas: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, FNT e IL-12p70.

Para avaliar o efeito do tratamento com o atazanavir na produção de citocinas pelos neuroblastos, foram incubadas 1×10^5 células por poço, por 24h, em placa de 24 poços, estéreis. Foram retirados 50 μ l do sobrenadante das culturas e foram quantificadas as concentrações da IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, FNT e IL-12p70 por citometria de fluxo, conforme instruções do fabricante. Foi utilizado o kit comercial “Human Inflammatory Cytokines Kit BD Cytometric Bead Array (CBA)”. Os experimentos e a leitura foram feitos uma vez em duplicata para cada ponto após homogeneização das amostras. As amostras foram lidas no citômetro de fluxo BD LRS FORTESSA, e analisadas pelo software FCAP Array v3.0 para Windows.

4.13 Detecção de proteínas Caspase-3

A detecção e a quantificação das proteínas Caspase-3 (Sigma) foram determinadas por reação antígeno-anticorpo marcado com fluorocromo e com detecção por citometria de fluxo. Para isto, as células foram primeiro aderidas e infectadas como descrito pelo item 4.5, seguido pelo tratamento com o atazanavir. Após estas etapas, as células foram fixadas com paraformaldeído 1% (Sigma), bloqueadas com albumina bovina (Sigma) e permeabilizadas com Tween, após estas etapas, em cada poço foi adicionado 1 μ L do anticorpo primário, diluído em 200 μ L de solução de 1% de BSA em STF, pH 7,2, por 24 horas a 6°C. Passado este período, as células foram novamente lavadas duas vezes com STF por 5 minutos, para remoção do excesso de anticorpo primário, seguido de nova incubação com a solução de 0,2% de triton X-100 em STF por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este procedimento, as células foram lavadas duas vezes com STF por 5 minutos, e então encubadas com 0,2 μ L do anticorpo secundário marcado com fluorocromo FITC, diluído em solução de 1% de BSA em STF, incubados por 2 horas ao abrigo da luz, em câmara úmida a 37°C e 5% de CO². Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com STF, e foi adicionado 200 μ L da solução STF/BSA, seguido de homogeneização para soltar as células aderentes do fundo da placa, e realizada a leitura foi feita em

citometria de fluxo. A análise foi realizada pelo citômetro de fluxo BD LRS FORTESSA, e o refinamento dos dados obtidos por software FlowJo, seguido de análise estatística pelo software Graphpad Prism 8 (GraphPad Software – San Diego, EUA).

4.14 Avaliação da morte dos neuroblastos por anexina/iodeto de propídio

Foi realizado o teste de avaliação da morte celular por apoptose/necrose pelos marcados anexina e iodeto de propídio, por citometria de fluxo. Os neuroblastos foram incubados por 24 horas, infectados ou não com o vírus Zika (MOI 0,1 e 1) e tratados ou não com as duas concentrações do atazanavir (1 e 3 μM).

Para isto, foram incubadas 1×10^5 células por poço em placa estéril de 96 poços de fundo chato, com meio DMEM (Sigma) sem o acréscimo de soro fetal bovino, em câmara úmida por 2 horas, para adesão das células ao fundo da placa. Passado o tempo de adesão, o sobrenadante foi desprezado para remoção das células não aderidas.

Passado o tempo de tratamento, o sobrenadante e as células foram transferidas para tubo cônico de 1,5mL e centrifugadas a 700 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi suspenso em 100 μL de STF à 37°C e ambientado por 5 minutos. Após isto, foi acrescentado em cada tubo 2 μL do marcador iodeto de propídio, seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, foi acrescentado 400 μL de STF e analisado em citômetro de fluxo.

A população de células foi dividida entre células vivas e células mortas, dependendo da intensidade de fluorescência apresentada. O experimento foi realizado em três triplicatas, e a viabilidade celular foi calculada pela frequência de células em cada grupo. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD LRS FORTESSA, e o refinamento dos dados obtidos por software FlowJo, seguido de análise estatística pelo software Graphpad Prism 8 (GraphPad Software – San Diego, EUA).

4.15 Avaliação da viabilidade por MTT

Para determinar a viabilidade dos neuroblastos, foi realizado o teste de citotoxicidade por redução do tetrazólio (MTT), onde as células foram incubadas por 24 horas. Para avaliar o efeito protetor do atazanavir (1 e 3 μM), o mesmo teste também foi realizado em neuroblastos infectados pelo Zika Vírus com MOI 0,1 e MOI 1, com tempo de adsorção de 1 hora. Para verificar se as EROs e ERNs e a via do NF-kB e a autofagia seriam importantes na viabilidade dos neuroblastos, alguns grupos foram incubados por 3 horas com inibidores e estímulos.

Reagente	Ação
APDC	Inibidor de ERNs
Diapocinina	Inibidor de EROs
PP242	Indutor de autofagia
Pepstatina	Inibidor da autofagia
JSH-23	Inibidor da p65
PMA	Indutor do NFkB
LPS	Indutor de inflamação
Zymosan A	Indutor de inflamação

4.16 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa Graphpad Prism para Windows (GraphPad Software – San Diego, USA). Para avaliar a normalidade da amostra foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. De acordo com a normalidade ou não das amostras foi utilizado teste paramétrico ou não paramétrico, respectivamente. Quando avaliados quatro grupos o teste utilizado foi ANOVA seguido de teste de Tukey para comparação múltipla entre os grupos, para amostras com distribuição normal. O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de comparação múltipla de Dunn foi utilizado quando a distribuição das amostras não era normal. Para comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste t quando a distribuição das amostras foi normal, ou o teste de Mann-Whitney quando a distribuição não foi normal. A comparação entre as variáveis

foi considerada estatisticamente significativa quando a diferença probabilística de ocorrência devida ao acaso foi menor do que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5.0 Aspectos morfológicos por microscopia eletrônica de transmissão

Para assegurar que o vírus estava infectando a célula, as células após a infecção foram preparadas conforme descrito no item (4.9) e analisadas no microscópio Jeol JEM-1011.

Observamos intensa presença do vírus no citoplasma do neuroblasto (Figura 5 e 6). Também observamos que a presença do vírus induziu necrose no neuroblasto (Figura 7).

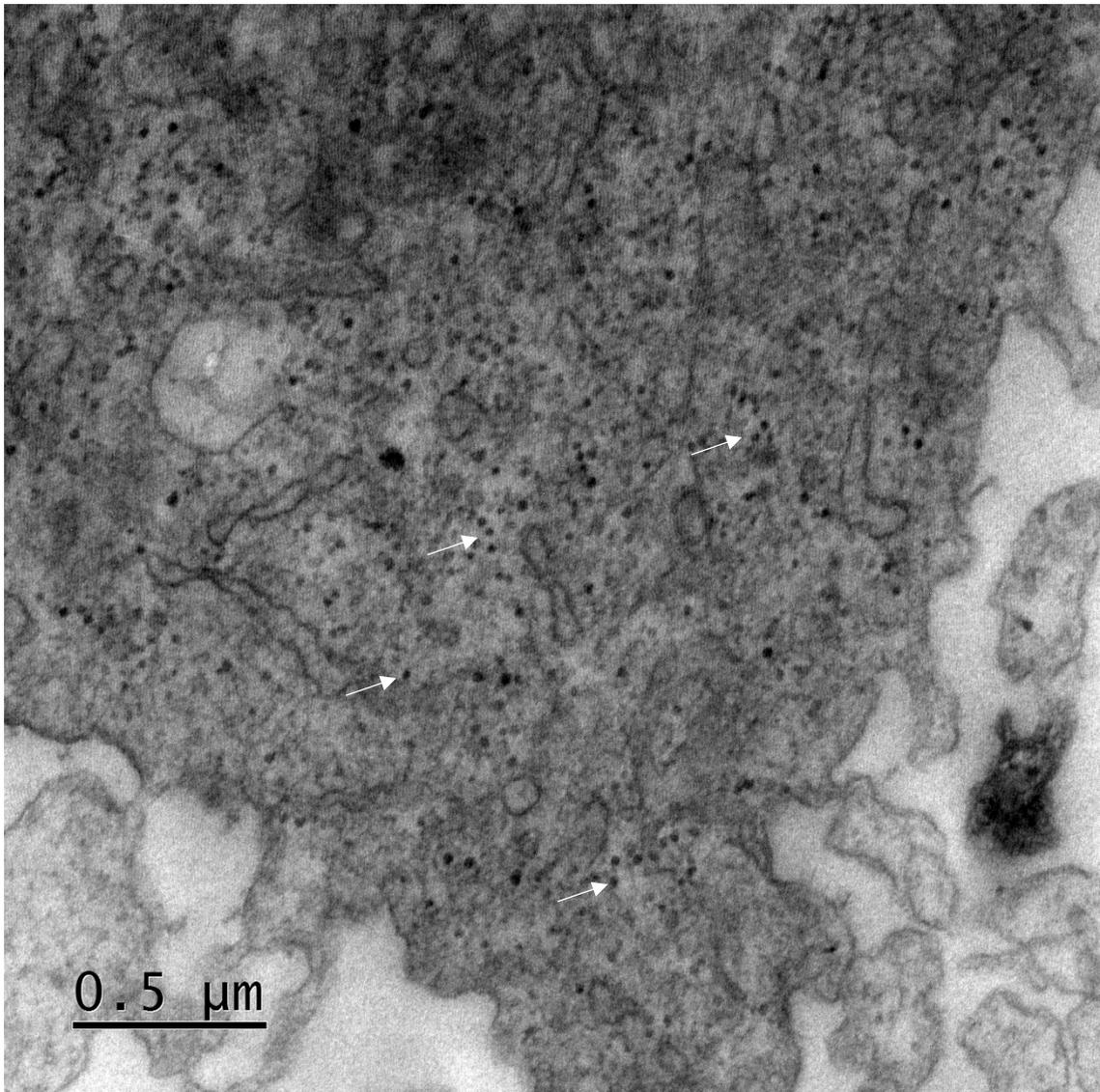


Figura 5: Avaliação da presença da infecção pelo vírus Zika em neuroblastos. Observa-se presença do vírus no citoplasma da célula. Setas brancas: Vírus Zika.

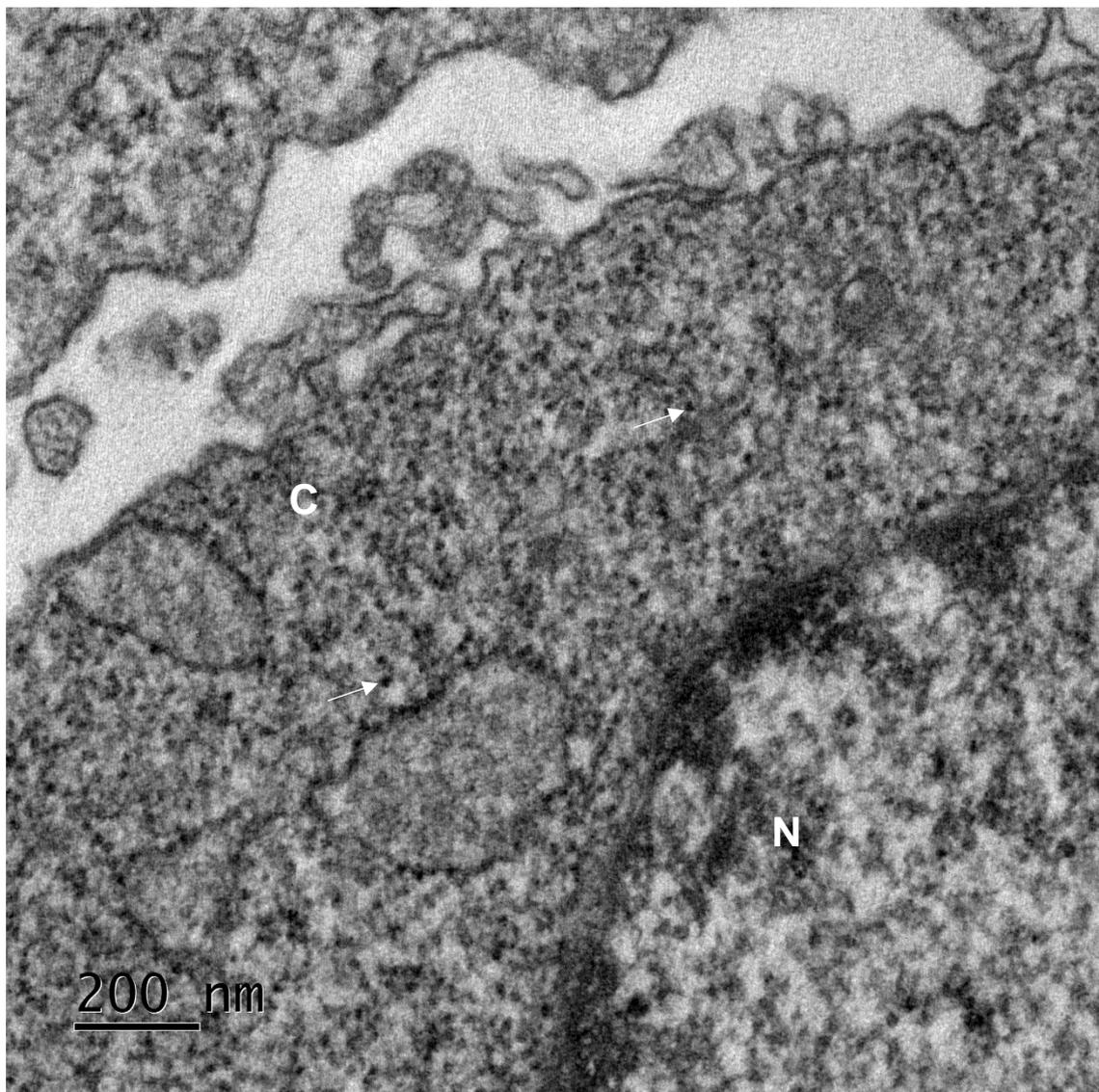


Figura 6: Avaliação da presença da infecção pelo vírus Zika em neuroblastos. Observa-se presença do vírus no citoplasma da célula. Setas brancas: Vírus Zika, N: Núcleo, C: Citoplasma.

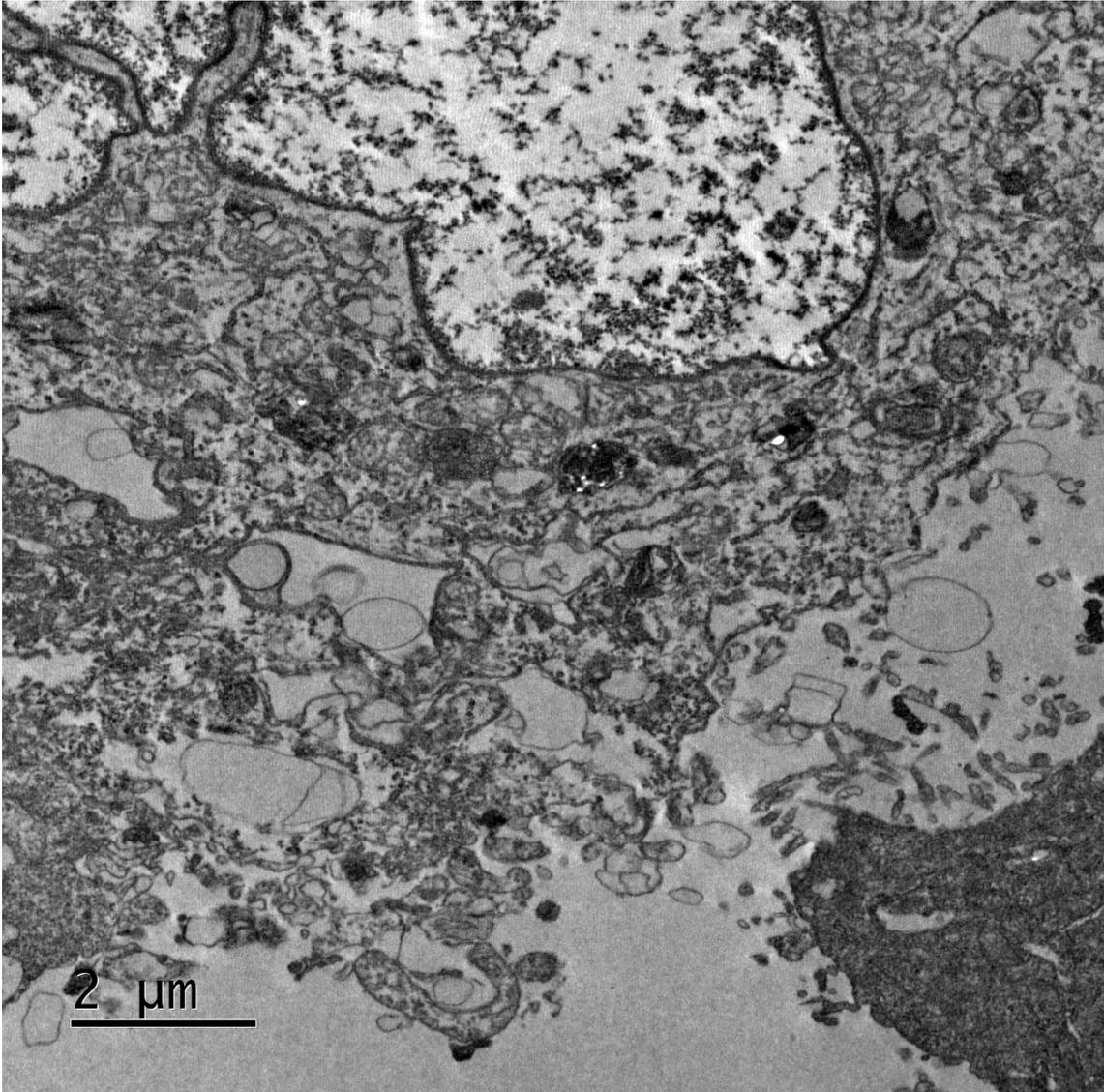


Figura 7: Avaliação da infecção do vírus Zika no neuroblasto. Observamos a presença de necrose no neuroblasto, perda de continuidade do citoplasma, indicando aumento da permeabilidade, vacuolização do núcleo e necrose.

5.1 Avaliação da viabilidade dos neuroblastos pelo teste do MTT

Para verificar o efeito direto do vírus Zika e se o atazanavir poderia ter um efeito protetor na viabilidade dos neuroblastos, foi realizado o ensaio do MTT após incubação das células por 24 horas, utilizando o vírus nas proporções de MOI 0,1 e 1 e o atazanavir na concentração de 1 e 3 µM. Observamos que o

vírus Zika reduziu a viabilidade das células em ambas as proporções utilizadas ($p=0,0006$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figura 8).

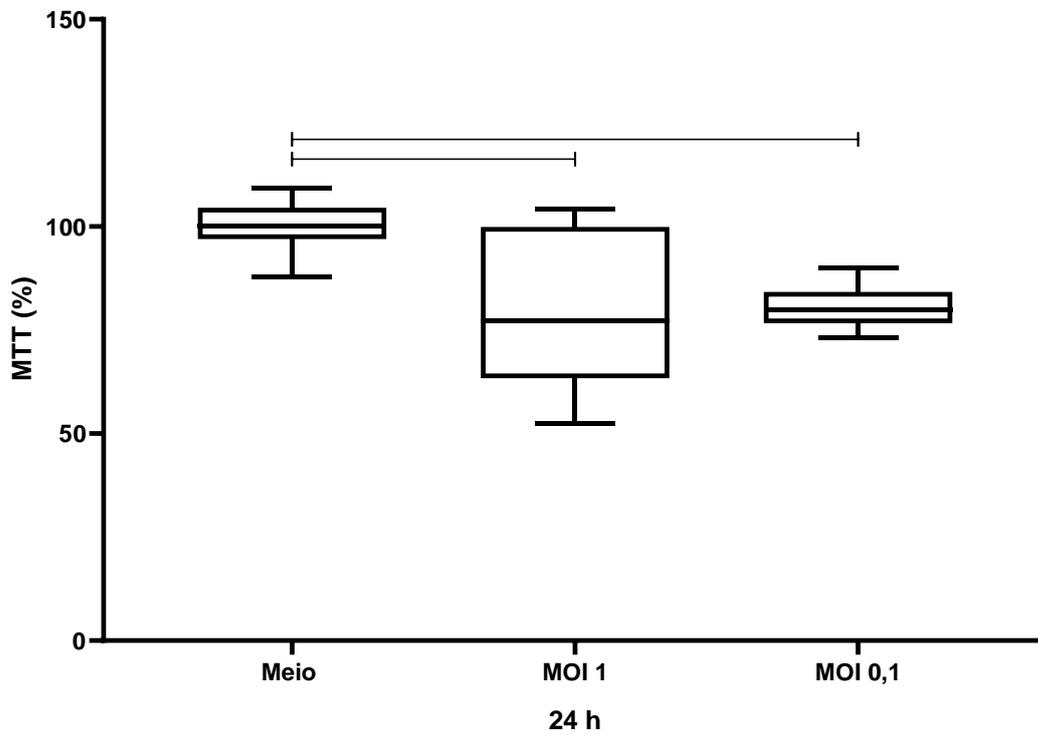


Figura 8: Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h, pelo teste do MTT e lida em espectrofotômetro. Houve redução da viabilidade em ambas as proporções do vírus ($p=0,0006$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Interessantemente, o atazanavir teve efeito protetor na concentração de $1 \mu\text{M}$, porém, mostrou efeito tóxico na concentração de $3 \mu\text{M}$ ($p<0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figura 9).

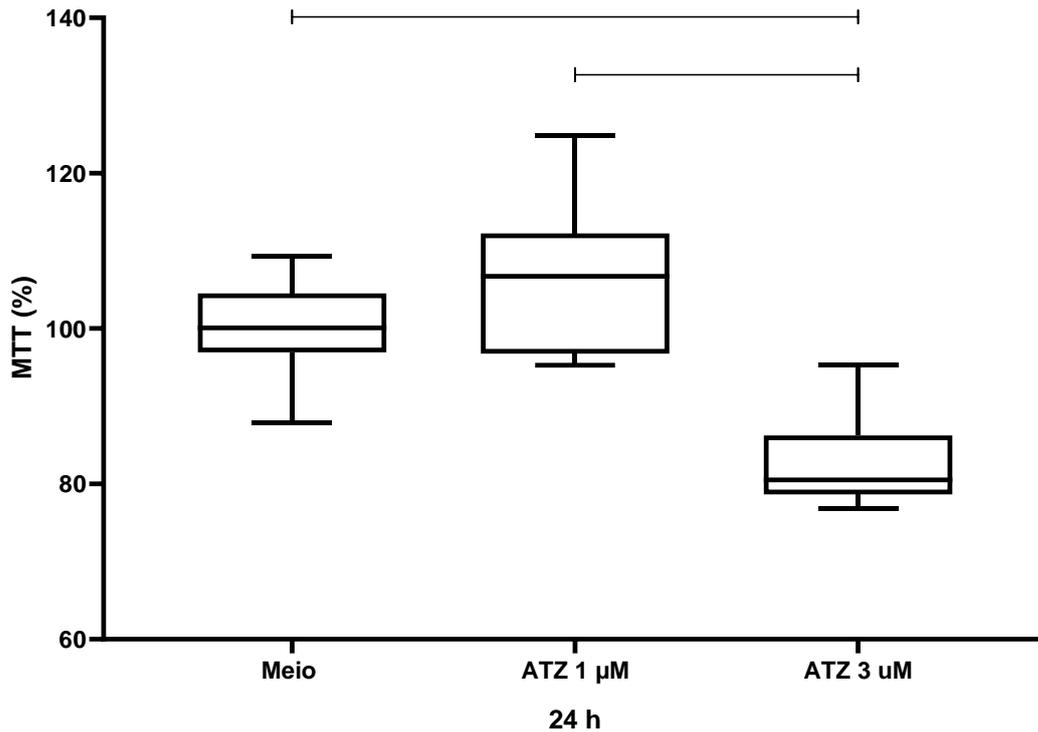


Figura 9: Influência do atazanavir (1 e 3 μM) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h, avaliada pelo teste do MTT e lida em espectrofotômetro. Na concentração de 1 μM o atazanavir aumentou a viabilidade dos neuroblastos. Entretanto, observou-se efeito tóxico na concentração de 3 μM ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando os neuroblastos foram incubados com o vírus Zika (0,1 MOI) junto com o medicamento atazanavir (1 e 3 μM), observamos recuperação parcial da depressão da viabilidade celular ocasionada pelo vírus Zika isoladamente, tanto para 1 e 3 μM do atazanavir ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figuras 10 A e B). Entretanto, quando foi avaliado

utilizando 1 MOI do vírus Zika, o atazanavir foi incapaz de reverter a toxicidade causada pelo vírus (Figuras 10 C e D),

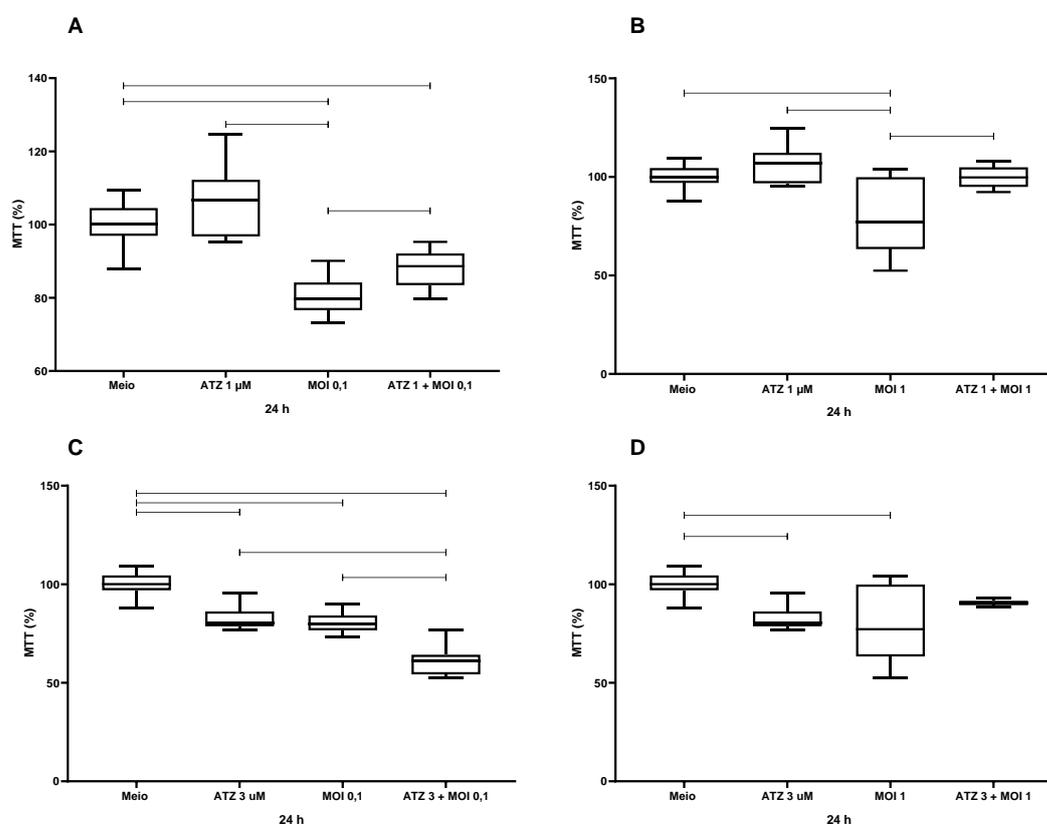


Figura 10: Influência do tratamento com o atazanavir (1 e 3 μM) sobre a viabilidade dos neuroblastos incubados com o vírus Zika (MOI 0,1 e 1) em cultura por 24h, pelo teste do MTT, lida em espectrofotômetro. Houve recuperação parcial da viabilidade pelo tratamento com 1 e com 3 μM do atazanavir. O atazanavir não recuperou a viabilidade para a concentração de 1 MOI do vírus. Em A; $p < 0,0001$, ANOVA seguido do teste de Tukey (Zika+atz > Zika); Em B: $p = 0,0037$, Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. ($p = 0,021$, Zika+atz > Zika- Mann-Whitney). Em C: O Virus Zika e o atazanavir foram tóxicos para os neuroblastos; Em D: Atazanavir não alterou a viabilidade dos neuroblastos incubados com o vírus Zika. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em síntese, o vírus Zika foi capaz de reduzir a viabilidade das células nos dois MOI. O atazanavir protegeu a célula na concentração 1 μM e foi tóxico na concentração 3 μM . O atazanavir 1 μM melhorou a viabilidade da célula na presença do vírus Zika em ambas as MOI.

5.2 Avaliação da morte celular por anexina/iodeto de propídio

Para melhor esclarecer o tipo de morte neuronal determinada pelo vírus Zika e a influência do atazanavir dependendo do tipo de morte celular por apoptose ou necrose foi avaliada a expressão de anexina e iodeto de propídio

nos neuroblastos, A expressão de anexina pelos neuroblastos foi realizada por citometria de fluxo, utilizando kit de Anexina/Iodeto de propídio (BD) para a detecção do tipo de morte celular que poderia estar acontecendo, após 24 horas de incubação com o vírus Zika com MOI 0,1 e 1, e também do medicamento na concentração de 1 e 3 μ M. Não observamos diferença estatística na expressão de anexina, que avalia a morte por apoptose, em neuroblastos quando incubados com 0,1 ou 1 MOI do vírus Zika (Figura 11). Indicando, portanto, que a morte celular dos neuroblastos determinada pelo vírus não ocorre preferencialmente por indução de apoptose.

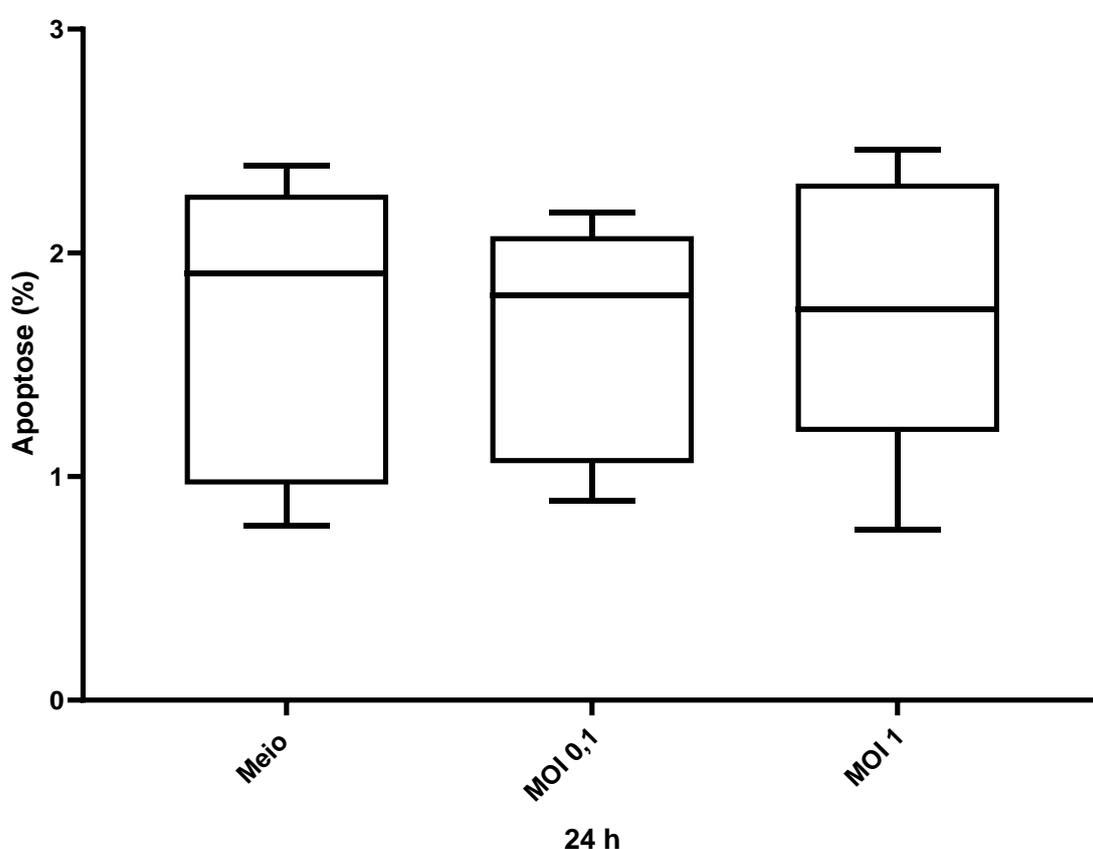


Figura 11: Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na apoptose dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por Kit de Anexina/Iodeto de propídio e lida em citometria de fluxo. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

O atazanavir também não modificou a porcentagem de células que estavam morrendo por apoptose. Não observamos diferença estatística entre os grupos (Figura 12).

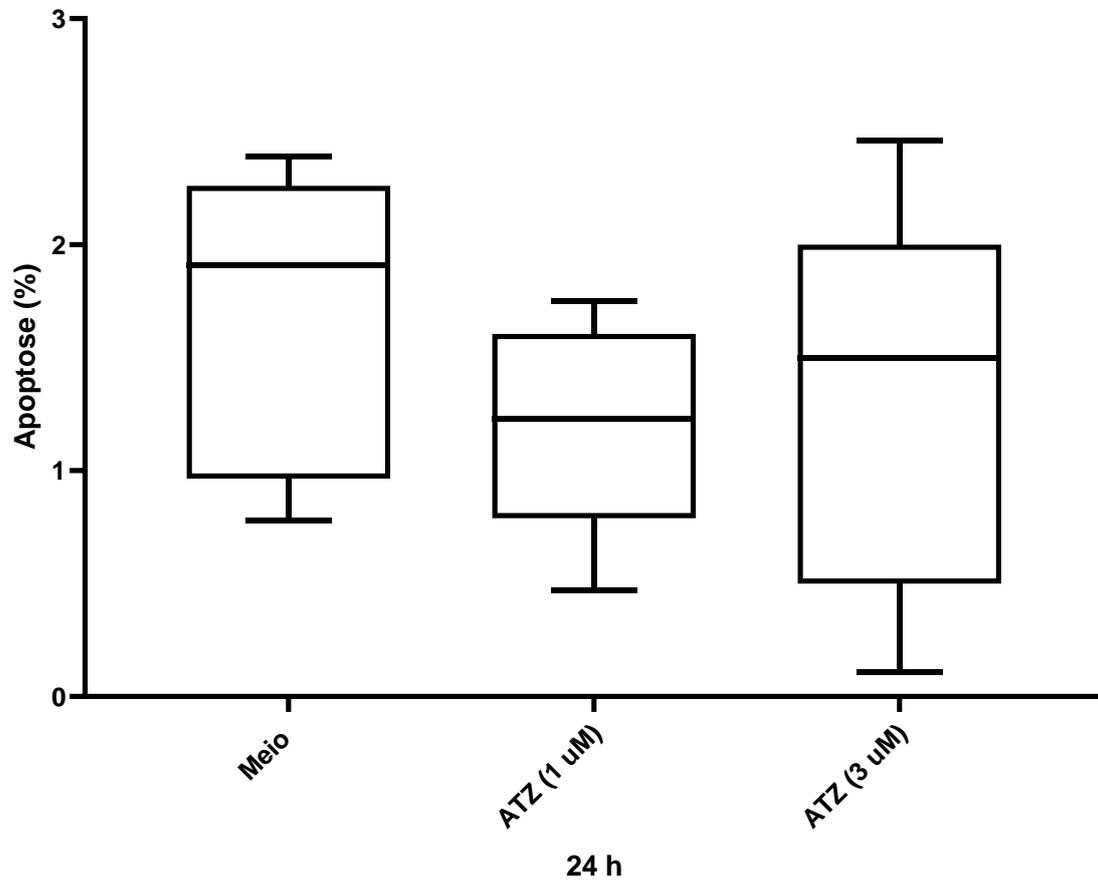


Figura 12: Influência do atazanavir (1 e 3 μM) na apoptose dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por Kit de Anexina/Iodeto de propídio e lida em citometria de fluxo. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Entretanto, quando foram incubados com os neuroblastos o vírus Zika (0,1 MOI) e o atazanavir simultaneamente, observamos que houve redução da morte celular por apoptose dos neuroblastos para 0,1 MOI do vírus Zika ($p=0,0122$, teste t), como também em comparação com o grupo Meio ($p=0,0215$, teste t) (Figura 13). Porém, esse efeito não foi observado quando uma maior proporção do vírus (1 MOI) foi utilizada em cultura (Figura 14).

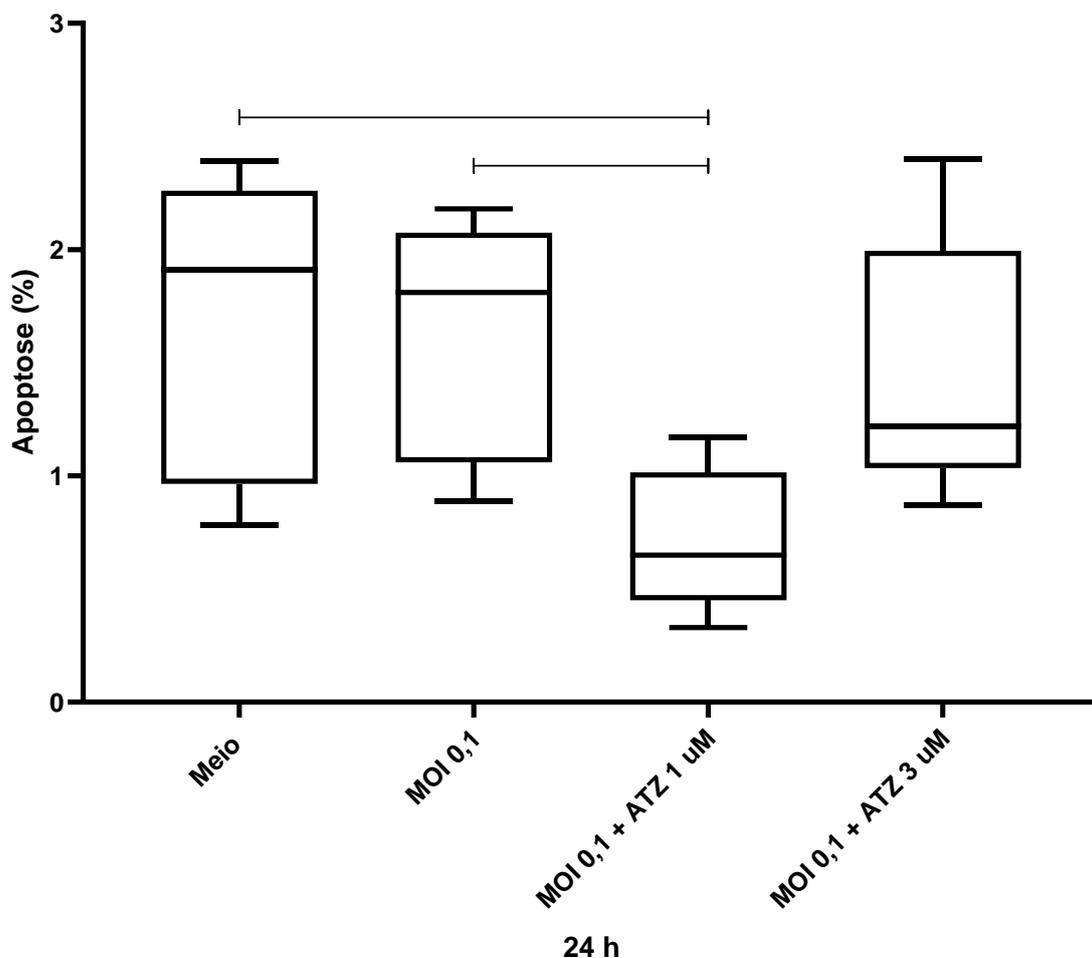


Figura 13: Influência do vírus Zika (MOI 0,1) e do atazanavir (1 e 3 μM) na apoptose dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por Kit de Anexina/Iodeto de propídio e lida em citometria de fluxo. O atazanavir reduziu a morte celular no grupo MOI 0,1 + ATZ 1 quando comparado com o grupo MOI 0,1 e Meio ($p=0,0122$, teste t) ($p=0,0215$, teste t), respectivamente. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

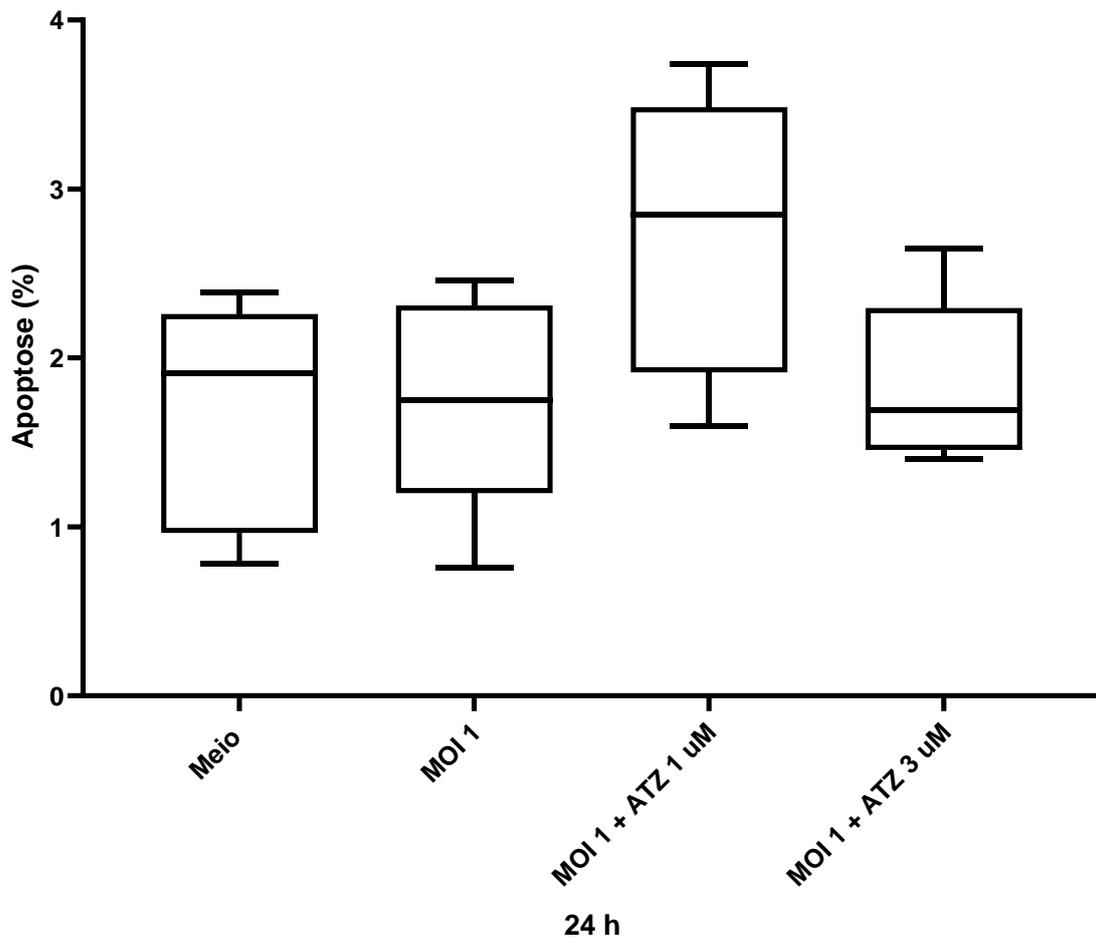


Figura 14: Influência do vírus Zika (MOI 1) e do atazanavir (1 e 3 μM) na apoptose dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por Kit de Anexina/Iodeto de propídio e lida em citometria de fluxo. Não houve diferença significativa. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

O marcador nuclear iodeto de propídio é utilizado para distinguir se a morte celular foi por apoptose ou por necrose. O iodeto de propídio insere-se no ADN se a membrana celular estiver permeável, ou seja, o reagente não penetra na célula cuja membrana celular está intacta, portanto, sua presença no núcleo indica que houve perda da permeabilidade celular. Observamos aumento da expressão de iodeto de propídio quando foi utilizado 1 MOI do vírus Zika, sugerindo que a morte dos neuroblastos para uma concentração maior do vírus deve estar ocorrendo preferencialmente por necrose celular ($p < 0,0128$, ANOVA seguido do método de comparação Tukey) (Figura 15).

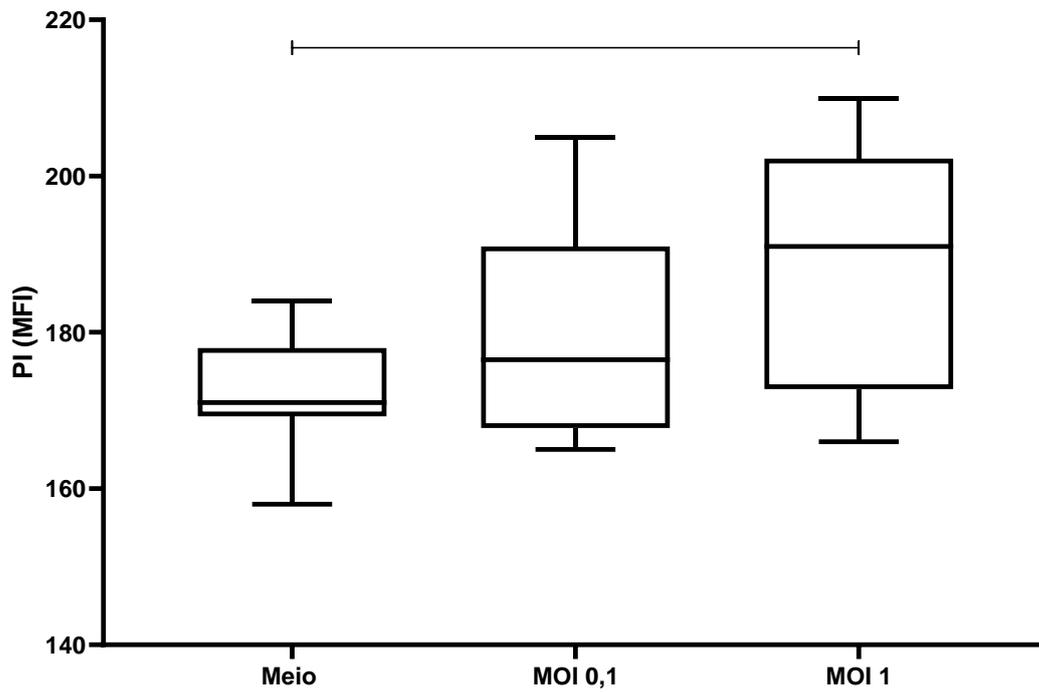


Figura 15: Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na necrose dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por Kit de Anexina/Iodeto de propídio e lida em citometria de fluxo. Observamos aumento da expressão de iodeto de propídio no grupo MOI 1 ($p < 0,0128$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando avaliamos a influência do atazanavir na expressão de iodeto de propídio, não observamos diferença estatística entre os grupos (Figura 16).

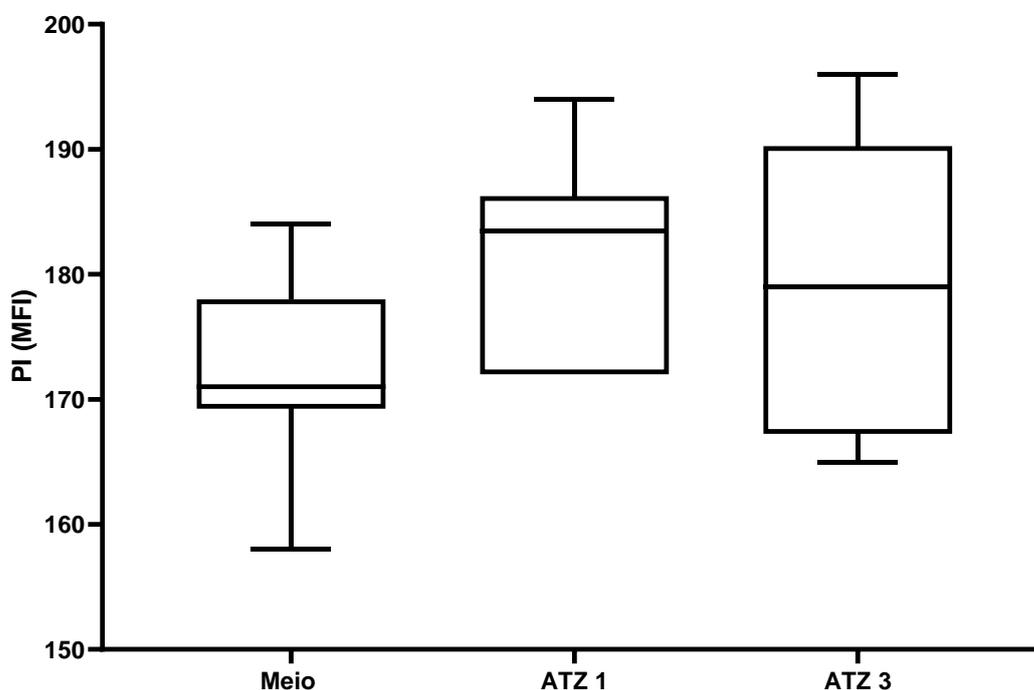


Figura 16: Influência do atazanavir (1 e 3 μM) na necrose dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por Kit de Anexina/iodeto de propídio e lida em citometria de fluxo. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao avaliarmos se na presença do atazanavir o vírus Zika na proporção de 0,1 MOI influenciaria a expressão do iodeto de propídio, observamos que, o grupo MOI 0,1 + ATZ 3 apresentou maior expressão do iodeto de propídio do que quando comparado com todos os outros grupos [com o grupo Meio ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey), ATZ 1 ($p < 0,0212$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey), ATZ 3

($p < 0,0082$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) e MOI 0,1 ($p < 0,0140$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey)] (Figura 17).

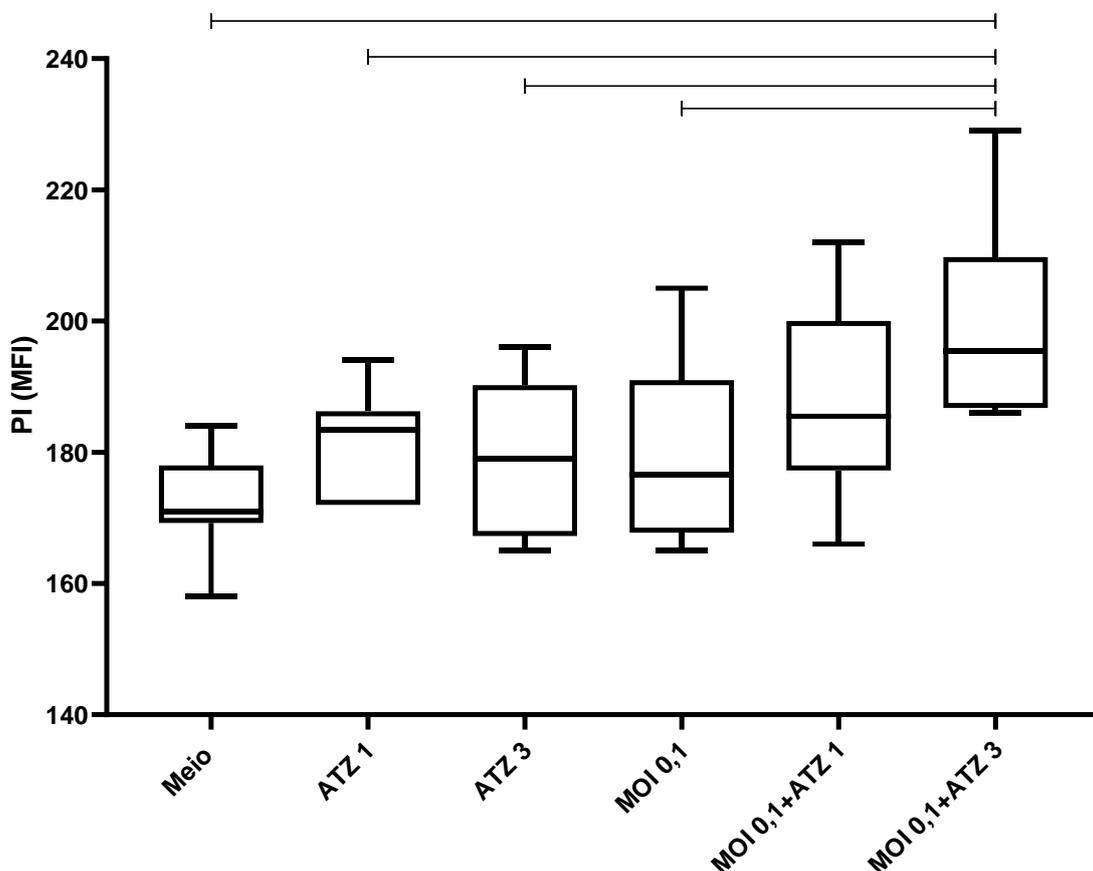


Figura 17: Influência do vírus Zika (MOI 0,1) do atazanavir (1 e 3 μM) na necrose dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por Kit de Anexina/Iodeto de propídio e lida em citometria de fluxo. Observamos maior expressão de iodeto de propídio no grupo MOI 0,1 + ATZ 3 quando comparados com o MOI 0,1 ($p < 0,0140$), ATZ 3 ($p < 0,0082$), ATZ 1 ($p < 0,0212$) e Meio ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando a expressão do iodeto de propídio foi testada na presença de 1 MOI do vírus Zika, observamos que a sua associação com o medicamento atazanavir na concentração de 1 μM aumentou a expressão de iodeto de propídio quando comparado com o grupo não infectado e não tratado (Meio) ($p < 0,0249$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Interessantemente, quando usado na concentração de 3 μM do Atazanavir, houve diminuição da expressão do marcador quando comparado com o grupo

MOI 1 e MOI 1 + ATZ 1 ($p < 0,0067$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figura 18).

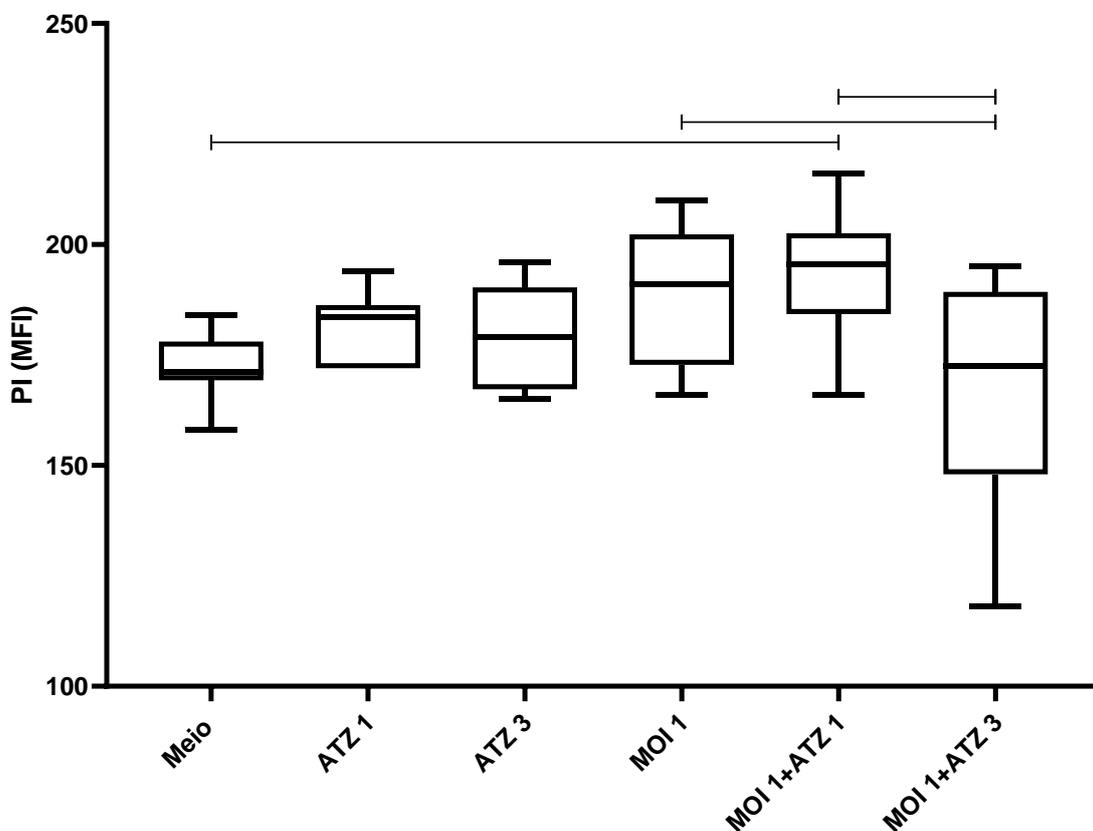


Figura 18: Influência do atazanavir (1 e 3 μM) na necrose dos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus ZIKA. A determinação foi realizada por Kit de Anexina/Iodeto de propídio e lida em citometria de fluxo. Observamos aumento da expressão de iodeto de propídio ao comparar o grupo Meio com o MOI 1 + ATZ 1 ($p < 0,0249$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey), interessante na maior proporção do medicamento observamos redução na expressão do marcador ($p < 0,0067$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em síntese, o atazanavir 1 μM reduziu a quantidade do marcador de apoptose nas células na presença do vírus Zika na MOI 0,1. Já para o marcador iodeto de propídio, observamos aumento do marcador na presença do atazanavir 3 μM e do vírus 0,1, entretanto, houve menor detecção do marcador quando a proporção do vírus foi 1.

5.4 Avaliação da expressão de Caspase-3

Para verificar o efeito do vírus Zika e do atazanavir na produção de Caspase-3 pelos neuroblastos, foi utilizada reação antígeno-anticorpo para a detecção da molécula, após incubação por 24 horas com 0,1 e 1 MOI do vírus Zika, com os neuroblastos tratados ou não com o medicamento, nas concentrações de 1 e 3 μ M, sendo a leitura realizado por citometria de fluxo.

O aumento da caspase-3 indica que houve dano na célula, e com a ativação da caspase-3 diversos substratos celulares serão clivados como a polimerase poli (ADP-Ribose), responsável pelo reparo de ADN, e culminando no apoptose celular.

Observamos que na maior proporção do vírus Zika por neuroblasto (grupo MOI 1) houve maior porcentagem de células expressando a caspase-3 do que no grupo com menor proporção do vírus (grupo MOI 0,1) ($p=0,0154$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figura 19).

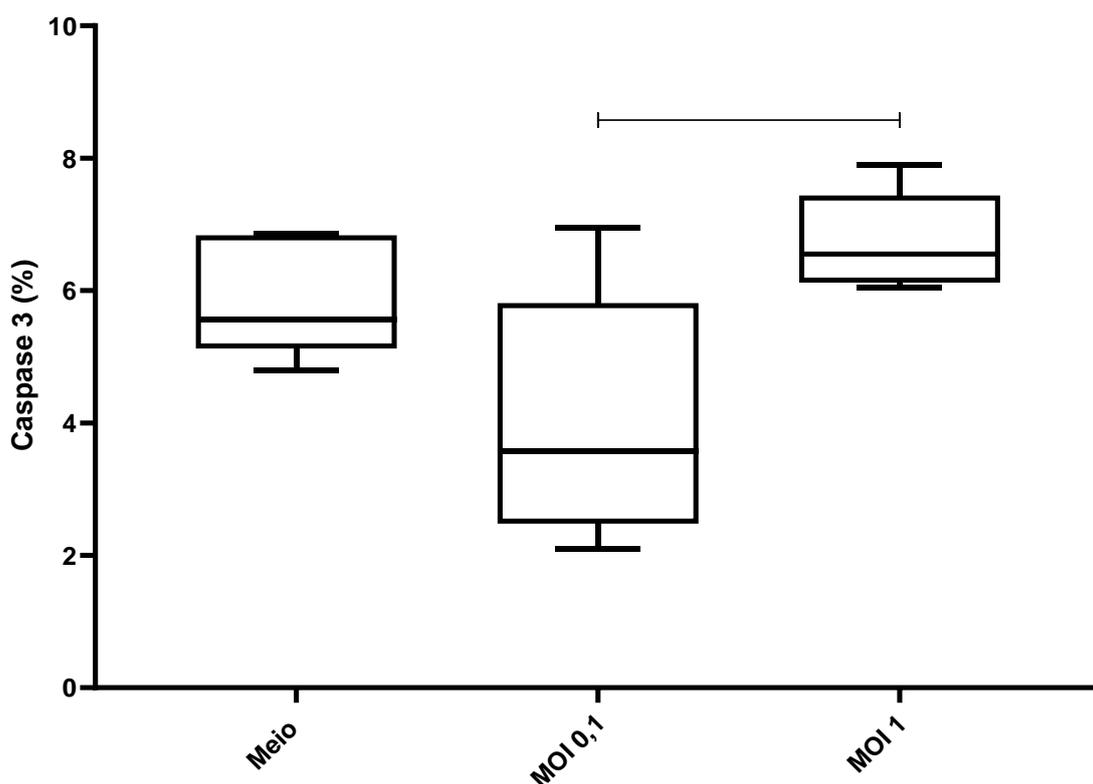


Figura 19: Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na ativação da caspase-3 nos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por reação antígeno-anticorpo e lida em citometria de fluxo. Houve aumento de caspase-3 no grupo MOI 1 quando comparado com o grupo MOI 0,1 ($p=0,0154$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Um dado interessante foi a redução da caspase-3 quando os neuroblastos foram tratados por 1 μM do atazanavir (grupo ATZ 1), quando comparado com os neuroblastos não tratados (grupo Meio) ($p=0,0250$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figura 20).

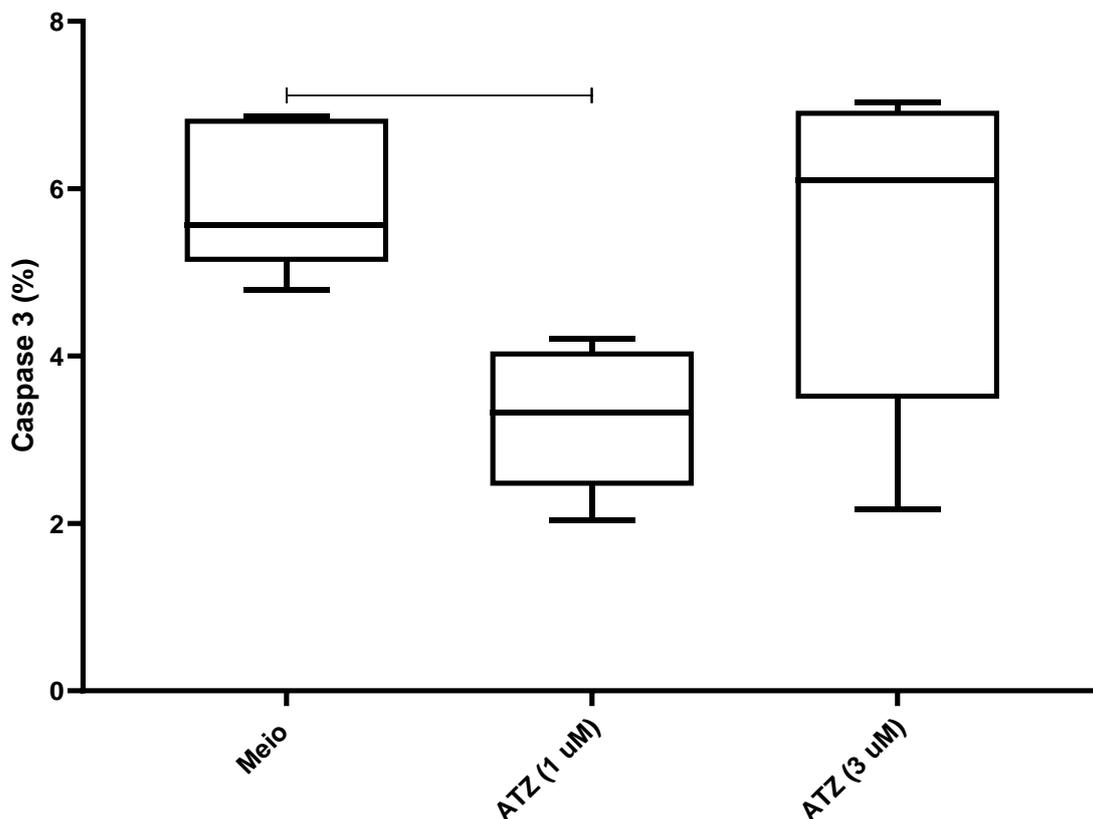


Figura 20: Influência do atazanavir (1 e 3 μM) na ativação da caspase-3 nos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por reação antígeno-anticorpo e lida em citometria de fluxo. O atazanavir na concentração de 1 μM reduziu a caspase-3 quando comparado com o grupo Meio ($p=0,0250$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Entretanto, quando o atazanavir (1 e 3 μM) foi acrescentado às culturas dos neuroblastos junto com 0,1 MOI do vírus ZIKA (grupo MOI 0,1), não observamos diferença estatística entre os grupos (Figura 21).

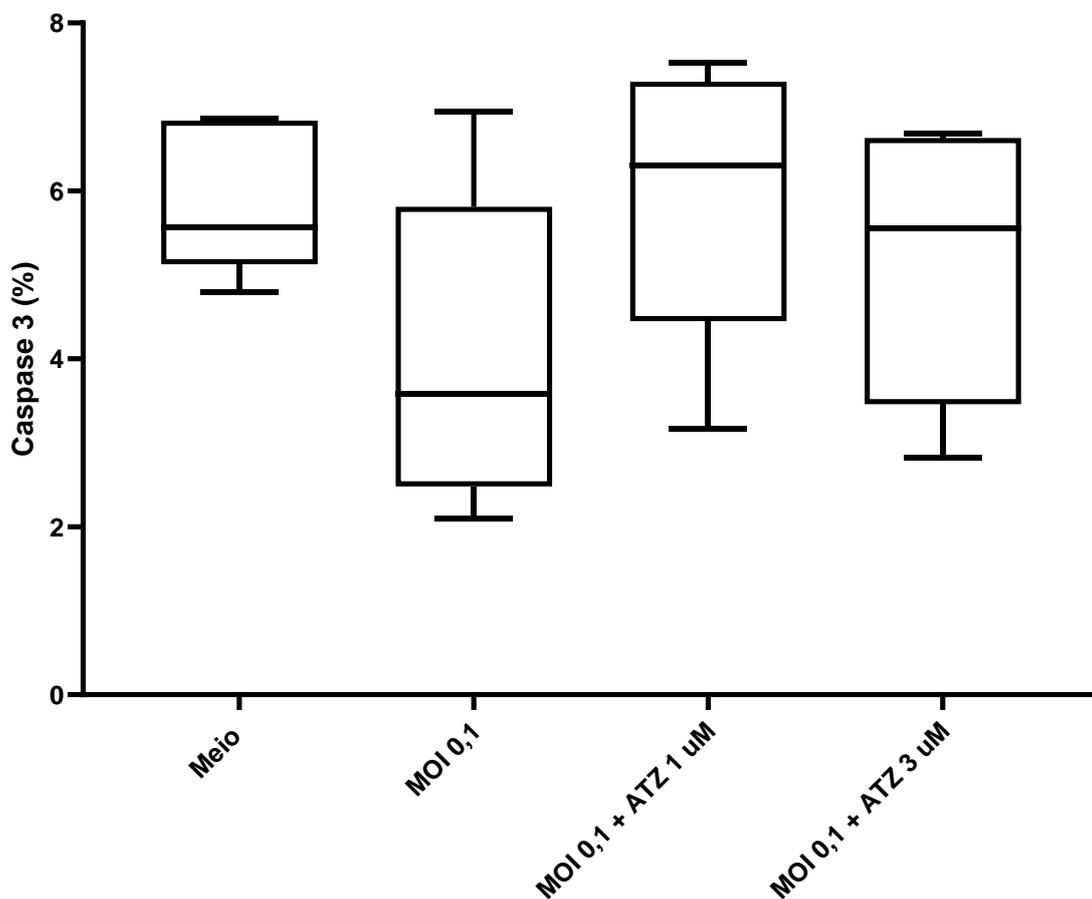


Figura 21: Influência do atazanavir (1 e 3 μM) na ativação da caspase-3 dos neuroblastos em cultura por 24h na presença do vírus Zika (MOI 0,1). A determinação foi realizada por reação antígeno-anticorpo e lida em citometria de fluxo. Não houve diferença significativa. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Resultado semelhante foi observado quando avaliamos na presença de uma proporção maior do vírus (grupo MOI 1) em associação com ambas as

proporções do medicamento. Não houve diferença estatística na expressão de caspase-3 entre os grupos (Figura 22).

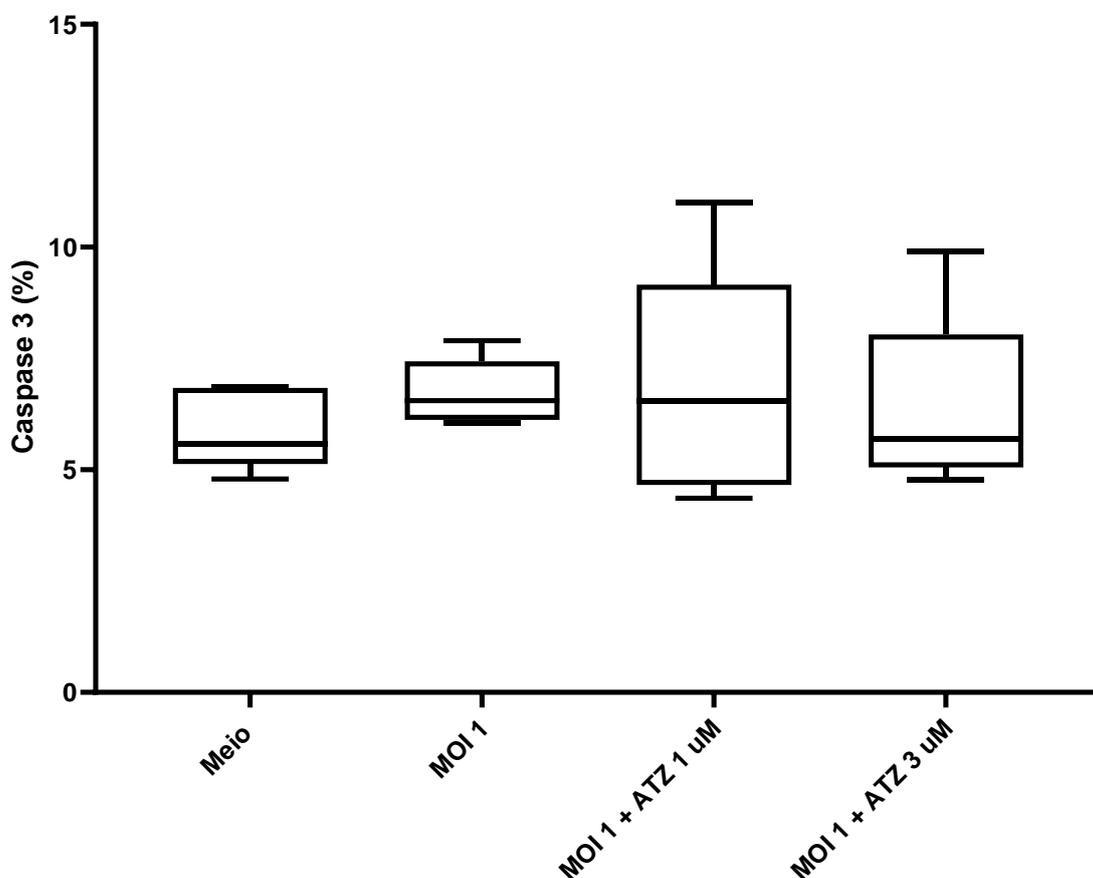


Figura 22: Influência do atazanavir (1 e 3 μM) ativação da caspase-3 nos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika. A determinação foi realizada por reação antígeno-anticorpo e lida em citometria de fluxo. Não houve diferença significativa. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Resumindo, a caspase-3 foi encontrada em maior quantidade na presença do vírus 0,1 e em menor quantidade na presença do atazanavir 1 μM .

5.5 Avaliação da influência da via do NF- κ B na viabilidade dos neuroblastos

Para melhor compreensão de quais os mecanismos de citotoxicidade para os neuroblastos determinados pelo vírus Zika e a influência do atazanavir nesse processo, a viabilidade dos neuroblastos foram estudadas pelo teste do MTT na presença do inibidor da via do NF κ B JSH-23. Para avaliar essa via do NF- κ B, os neuroblastos foram incubadas com o indutor da via (PMA) e com o inibidor (JSH-23) por 3 horas, e posteriormente incubadas por 24 horas na presença ou

ausência do vírus Zika e na presença ou ausência do atazanavir e a viabilidade foi avaliada pelo ensaio do MTT, e lida em espectrofotômetro.

Observamos que na presença do indutor do NF- κ B a viabilidade dos neuroblastos foi reduzida em todos os grupos ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figura 23).

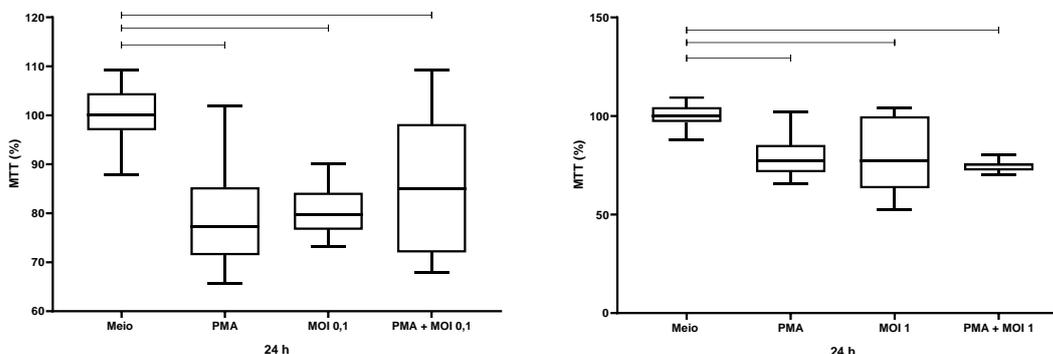


Figura 23: Influência do indutor do NF- κ B (PMA), na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1), na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada pelo teste do MTT e lida em espectrofotômetro. Houve redução da viabilidade na presença do indutor na presença ou não do vírus Zika em ambas as proporções do vírus ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Interessantemente, também na presença do inibidor da via do NF- κ B houve redução da viabilidade dos neuroblastos, mas houve um efeito protetor da

viabilidade dos neuroblastos quando a inibição com o JSH-23 ocorreu na presença da proporção de 1 MOI do vírus Zika ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figura 24).

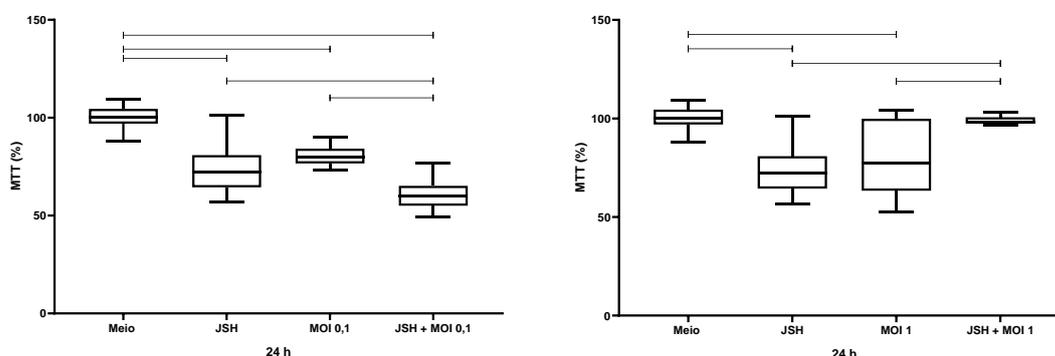


Figura 24: Influência do inibidor do NF- κ B (JSH-23) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por MTT e lida em espectrofotômetro. Houve redução da viabilidade na presença do indutor na presença ou não do vírus Zika em ambas as proporções ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em síntese, tanto o inibidor quanto o indutor reduziram a viabilidade das células.

5.6 Avaliação da influência da autofagia na viabilidade dos neuroblastos

Para avaliar se a autofagia seria importante, as células foram incubadas com o indutor (PP242) e com o inibidor (Pepstatina) por 3 horas, e posteriormente incubadas para encerrar o ciclo de 24 horas, a viabilidade foi avaliada pelo ensaio do MTT e lida em espectrofotômetro.

Já para a autofagia, não observamos diferença na viabilidade quando o indutor foi administrado isolado na célula, também notamos uma redução da viabilidade quando administrado o indutor da autofagia com o vírus na proporção 1 ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figura 25).

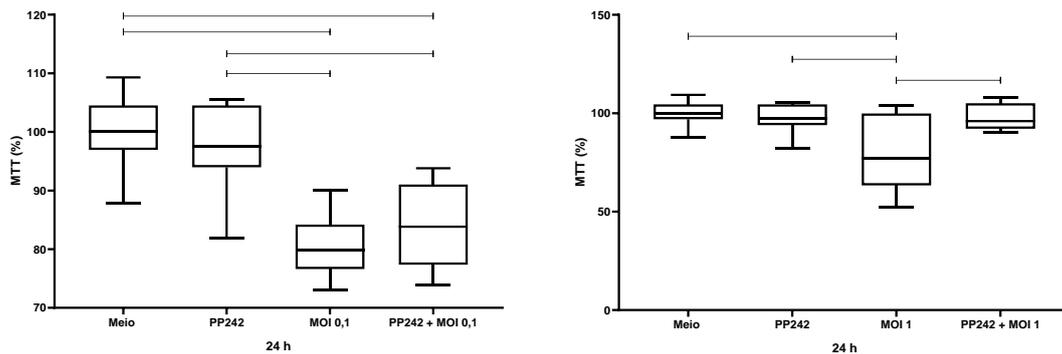


Figura 25: Influência do indutor da autofagia (PP242) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por MTT e lida em espectrofotômetro. A presença do indutor de autofagia reduziu a viabilidade da célula na presença do vírus Zika na proporção MOI 0,1 ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey), interessante, observamos que na proporção 1 do vírus a sua associação com o indutor auxiliou na viabilidade da célula ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando administrado o inibidor da autofagia, não observamos diferença significativa quando foi administrado isolado, entretanto, observamos redução da viabilidade quando o inibidor esteve associado ao vírus em ambas as proporções ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 26).

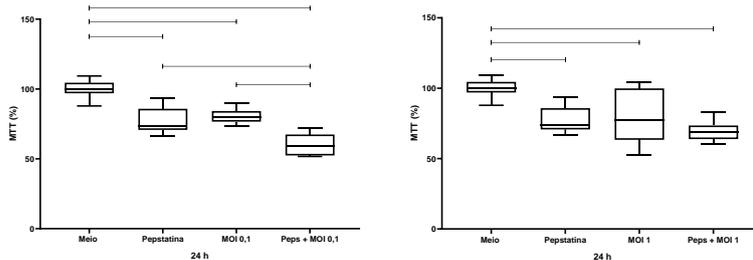


Figura 26: Influência do inibidor da autofagia (Pepstatina) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por MTT e lida em espectrofotômetro. Observamos redução da viabilidade dos neuroblastos em ambas as proporções do vírus Zika quando associados ao inibidor ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn), entretanto, para a proporção 1 do vírus Zika, não observamos diferença entre este grupo e sua associação com o inibidor. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Resumindo, não houve diferença na viabilidade na presença do indutor e inibidor isoladamente com a célula, entretanto, o vírus reduziu a viabilidade em ambas as proporções para o inibidor e na proporção 0,1 para o indutor.

5.7 Avaliação da influência das ERNs na viabilidade dos neuroblastos

Para verificar o papel das espécies reativas de nitrogênio na viabilidade dos neuroblastos na presença do vírus Zika, as células foram incubadas por 3 horas com o inibidor da produção de espécies reativas de nitrogênio o APDC, e com o LPS que promove o estímulo da inflamação. Observamos que a inibição das ERNs foi significativamente tóxica para a célula ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 27).

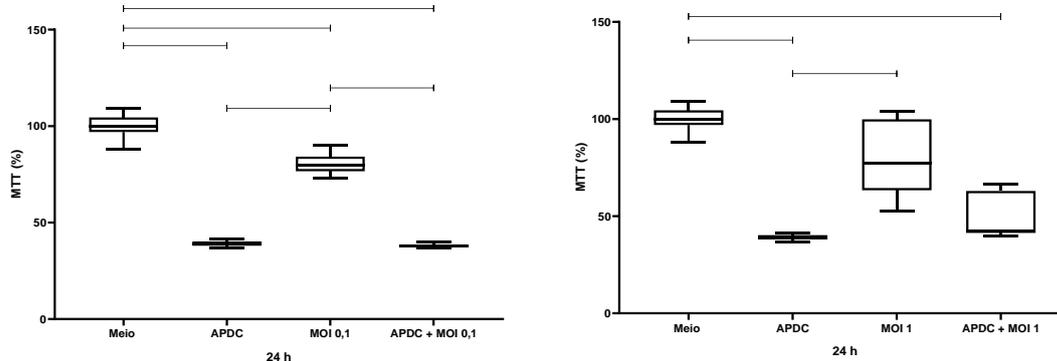


Figura 27: Influência do inibidor de ERNs (APDC) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada pelo teste do MTT e lida em espectrofotômetro. Houve redução drástica da viabilidade na presença do inibidor ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Entretanto, quando usamos na cultura o LPS para estimular a produção das espécies reativas de nitrogênio, observamos também redução da viabilidade

dos neuroblastos, tanto isoladamente, quanto associado ao vírus Zika em ambas as proporções ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 28).

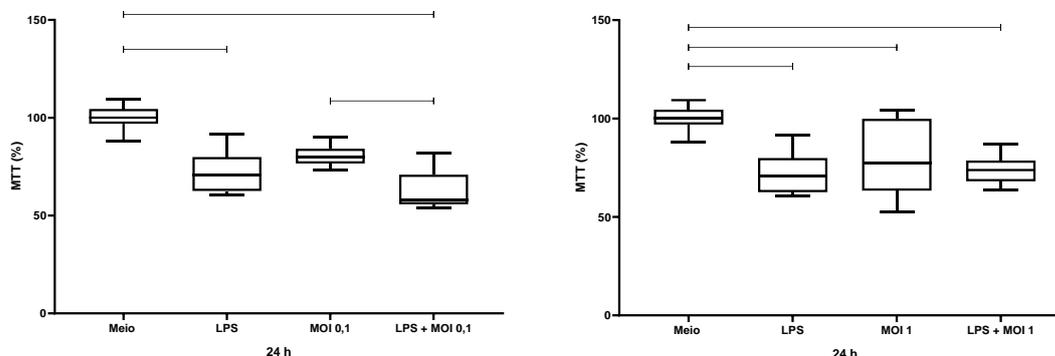


Figura 28: Influência do indutor de ERNs (LPS) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por MTT e lida em espectrofotômetro. Observa-se redução da viabilidade na presença do indutor de inflamação tanto isolado quanto associado ao vírus Zika ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em síntese, a inibição das ERNs foi extremamente tóxica para a célula, o seu indutor também reduziu a viabilidade, porém, de forma menos expressiva que o inibidor.

5.8 Avaliação da influência das EROs na viabilidade dos neuroblastos

Para verificar o papel da presença de espécies reativas de oxigênio na viabilidade dos neuroblastos, o teste do MTT foi realizado na presença do inibidor de produção de EROS a diapocinina e após estímulo para produção de EROs com o Zymosan, após incubação dos neuroblastos por 24 horas com ou sem MOI 0,1 e 1, na presença ou ausência do inibidor ou do estímulo. Observamos que a vírus na proporção 0,1 MOI reduziu a viabilidade dos neuroblastos, e na presença do inibidor da produção do EROs, não foi capaz de reverter a inibição da viabilidade dos neuroblastos ($p = 0,0007$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 29). O mesmo ocorrendo quando 1 MOI do vírus Zika foi testado.

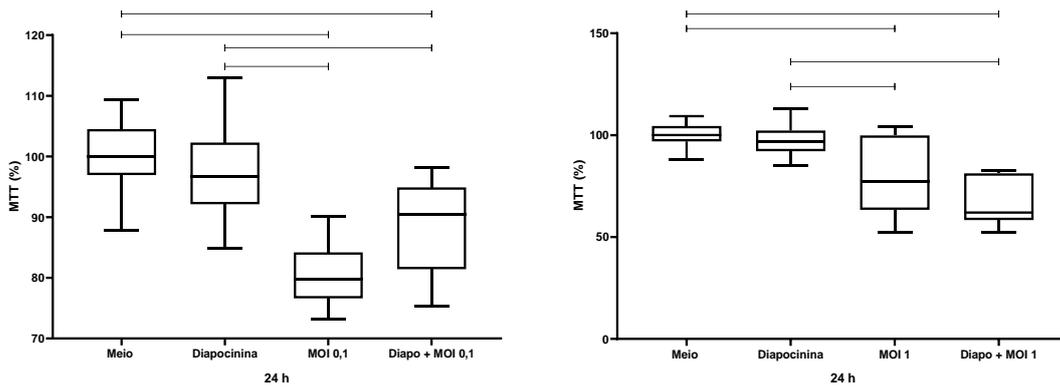


Figura 29: Influência do inibidor de EROs (Diapocinina) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da viabilidade dos neuroblastos foi realizada por teste do MTT e lida em espectrofotômetro. Houve redução da viabilidade quando associado o inibidor com o vírus Zika em ambas as proporções ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Menor viabilidade dos neuroblastos também foi observada quando um estímulo para produção de EROS feita com o Zymosan. Quando o estímulo foi acrescentado à cultura, observamos também redução da viabilidade dos neuroblastos, tanto isolado, quanto associado ao vírus Zika em ambas as proporções ($p < 0,0001$ ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figura 30).

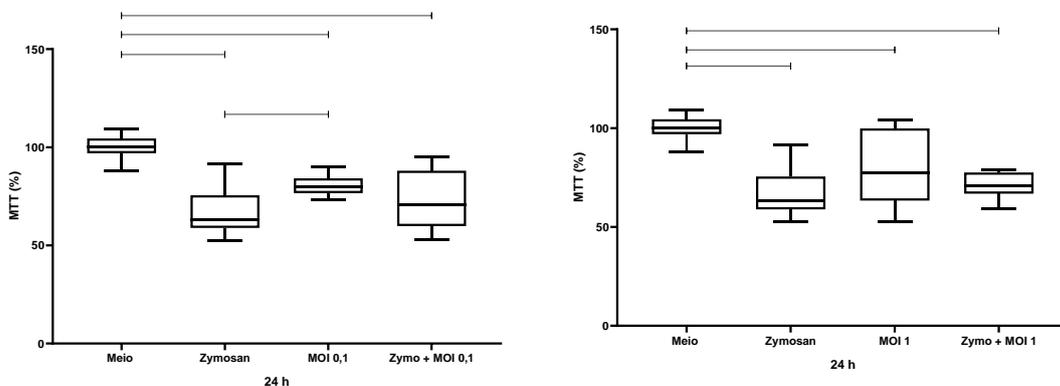


Figura 30: Influência do indutor de EROs (Zymosan) na presença ou não do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na viabilidade dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada pelo teste do MTT e lida em espectrofotômetro. Observamos redução da viabilidade celular ~~na~~ pelo indutor isoladamente e também quando associado ao vírus Zika em ambas as proporções ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey).

Resumindo, houve redução da viabilidade na presença do indutor de EROs, o que não foi observado para o inibidor.

5.9 Avaliação da produção de EROs pelos neuroblastos

Os neuroblastos podem produzir radicais de oxigênio que têm funções críticas na diferenciação, proliferação e apoptose celular. Para verificar o efeito do vírus Zika e do atazanavir na produção de EROs nos neuroblastos, foi realizado citometria de fluxo utilizando sondas específicas para a detecção das espécies reativas de oxigênio, após incubação por 24 horas com MOI 0,1 e 1 do vírus Zika, e também na presença ou ausência do atazanavir, na proporção de 1 e 3 μ M. Observamos que a vírus na proporção 0,1 MOI reduziu a concentração de EROs produzida pelos neuroblastos ($p=0,0007$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 31).

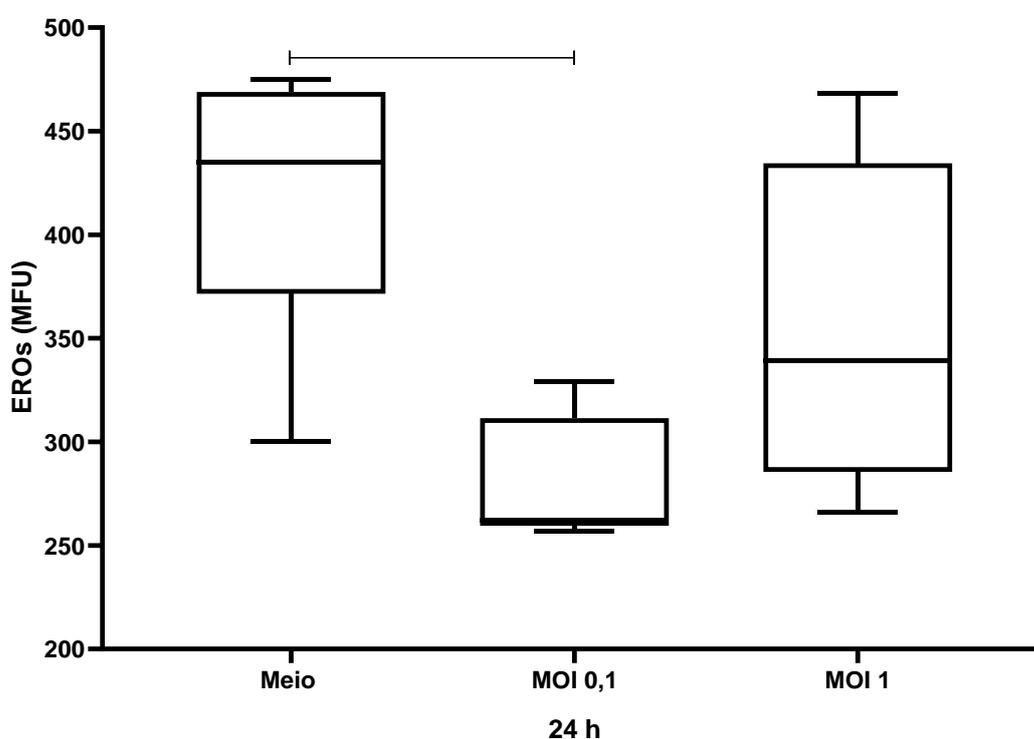


Figura 31: Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Houve redução estatisticamente significativa da produção de EROs quando o vírus foi utilizado para a proporção de MOI 0,1 ($p=0,0007$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Observamos que o atazanavir também reduziu a produção de EROs em ambas as concentrações ($p=0,00013$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figura 32).

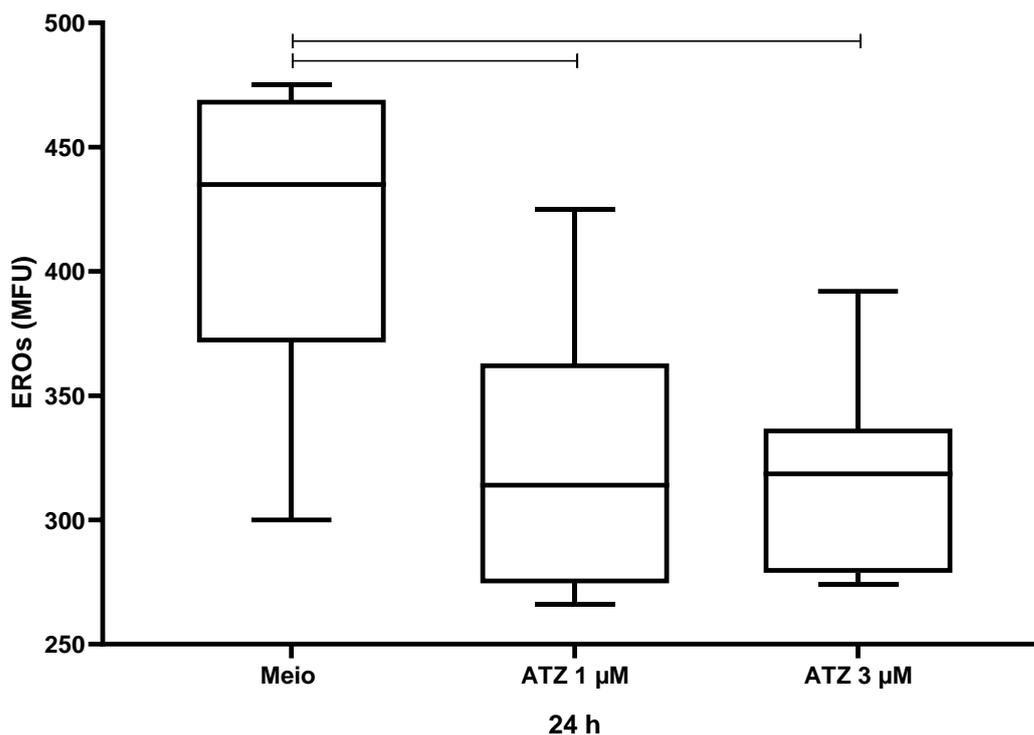


Figura 32: Influência do atazanavir (1 e 3 μM) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. O atazanavir reduziu a produção de EROs em ambas as concentrações ($p=0,00013$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

No intuito de verificar se o atazanavir afetaria a produção de EROs após a infecção dos neuroblastos pelo vírus Zika, a produção de EROs pelos neuroblastos foi avaliada por citometria de fluxo utilizando sondas específicas para a detecção das espécies reativas de oxigênio, após incubação de 24 horas dos neuroblastos na presença ou ausência do vírus Zika para MOI 0,1 e 1 e na presença ou ausência do atazanavir nas concentrações de 1 e 3 μM . Observamos que na proporção de 1 μM , o medicamento aumentou a produção de EROs quando comparado com o grupo infectado não tratado ($p=0,0242$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). O mesmo foi observado quando a proporção do medicamento foi maior ($p=0,043$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 33).

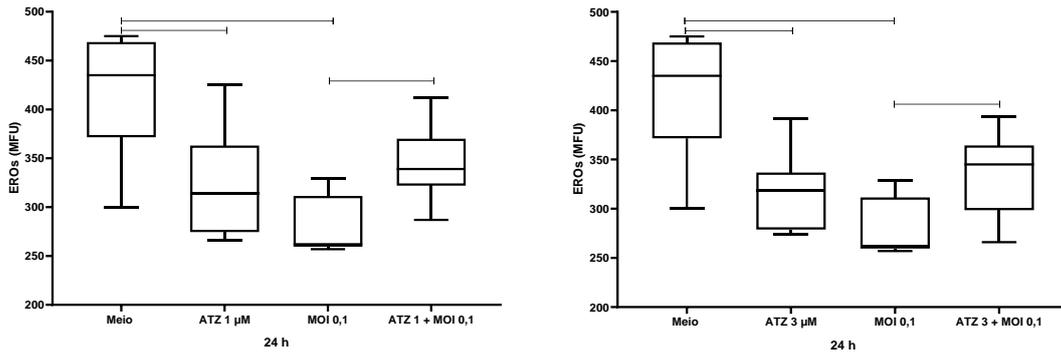


Figura 33: Influência do vírus Zika (MOI 0,1) e do atazanavir (1 µM) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Houve aumento da produção de EROs no grupo ATZ 1 + MOI 0,1 comparado com o grupo MOI 1 ($p=0,0242$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Houve aumento da produção de EROs no grupo ATZ 3 + MOI 0,1 quando comparado com o grupo MOI 0,1 ($p=0,043$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao aumentar a proporção de vírus, observamos que no grupo ATZ 1 + MOI 1 a produção de EROs foi maior que no ATZ 1 ($p=0,0103$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey), porém, na proporção de 3 µM do medicamento e na proporção de 1 do vírus, não observamos diferença significativa entre os grupos (Figura 34).

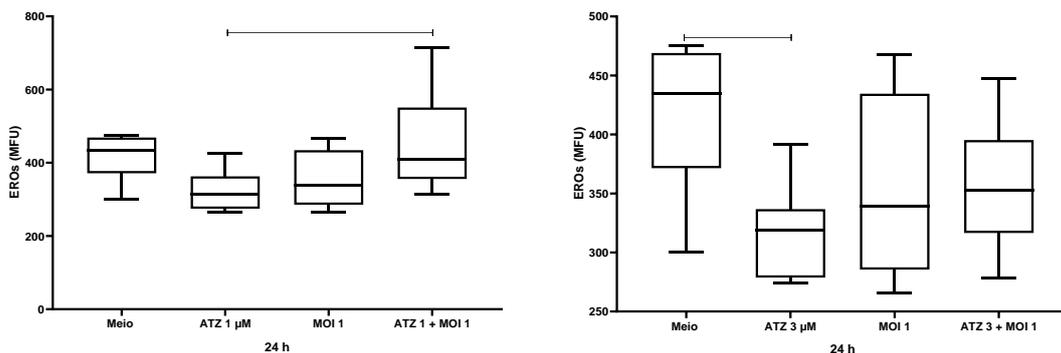


Figura 34: Influência do vírus Zika (MOI 1) e do atazanavir (1 µM) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Houve aumento de produção de EROs no grupo ATZ 1 + MOI 1 quando comparado com o grupo ATZ 1 ($p=0,0103$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

No intuito de melhor compreender os mecanismos de regulação da produção de EROs pelos neuroblastos, foram avaliadas a produção dessas espécies reativas pelos neuroblastos na presença de um estímulo para produção de EROs pelos neuroblastos com PMA e na presença do inibidor Diapocinina da produção de EROs, e avaliado após 24 horas de incubação, e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo. Observamos que, paradoxalmente, na presença do estímulo com o PMA houve menor produção de EROs pelos neuroblastos ($p < 0,0001$, teste de Mann-Whitney) (Figura 35).

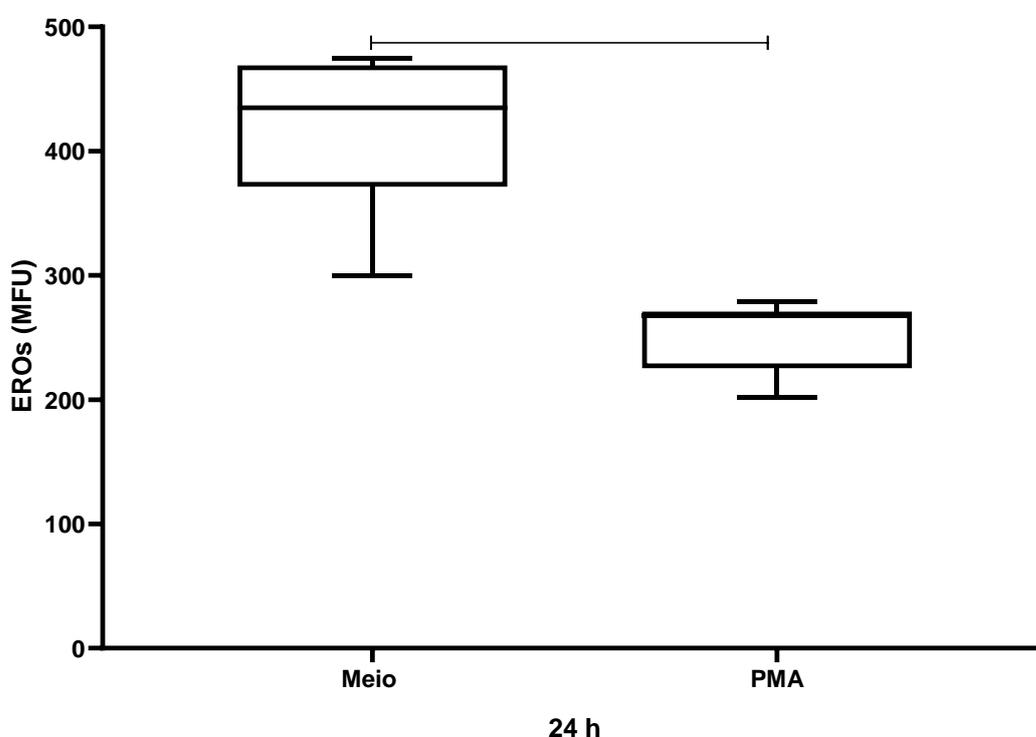


Figura 35: Influência do estímulo (PMA) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Houve redução da produção de EROs no grupo incubado com o PMA ($p = 0 < 0001$, Teste de Mann-Whitney). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Observamos que o atazanavir na proporção 3 μM apresentou menor produção de EROs quando comparado com o grupo sem tratamento (Meio)

($p=0,0106$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 36).

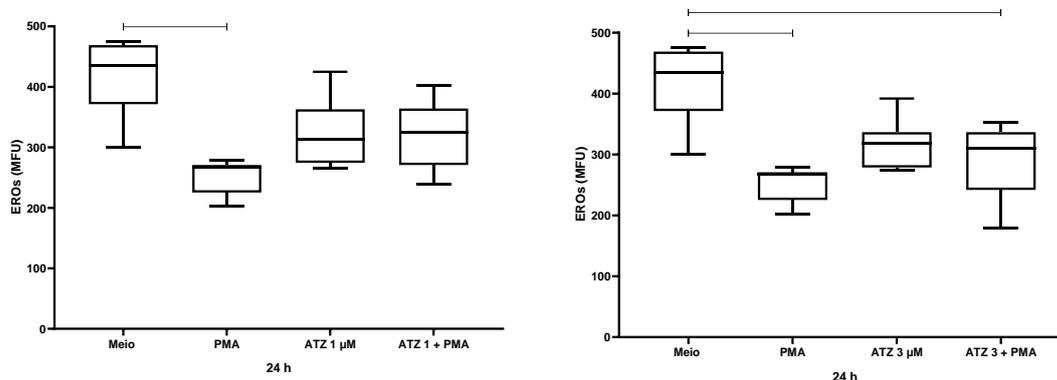


Figura 36: Influência do atazanavir (1 e 3 μM) na presença de estímulo (PMA) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Houve redução da produção de EROs no grupo ATZ 3 + PMA quando comparado com o grupo neuroblasto ($p=0,0106$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Já quando na presença do vírus, observamos que em ambas as proporções do Zika, a concentração de EROs foi menor quando comparada com o grupo dos neuroblastos não infectados ($p<0,05$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 37).

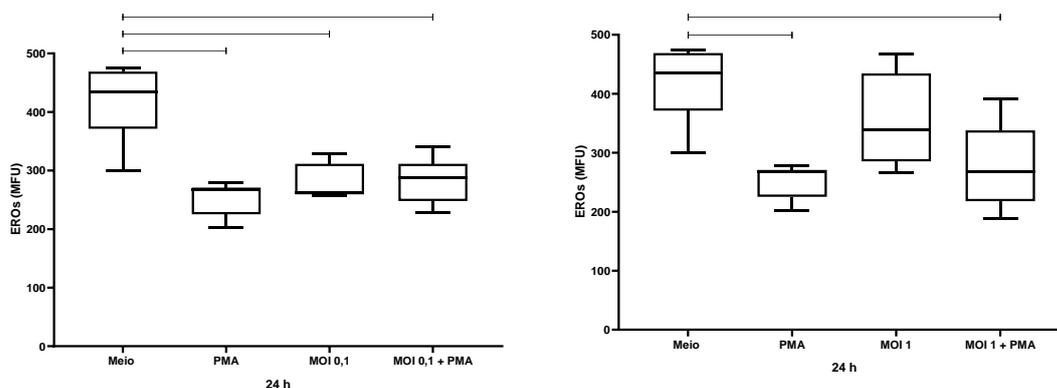


Figura 37: Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na presença de estímulo (PMA) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Houve redução de produção de EROs em todos os grupos quando comparados com o grupo dos neuroblasto não infectados (meio) ($p<0,05$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando incubamos os neuroblastos com o inibidor de EROs diapocinina, observamos que houve menor produção de EROs pelos neuroblastos tratados ($p=0,0025$, teste t) (Figura 38).

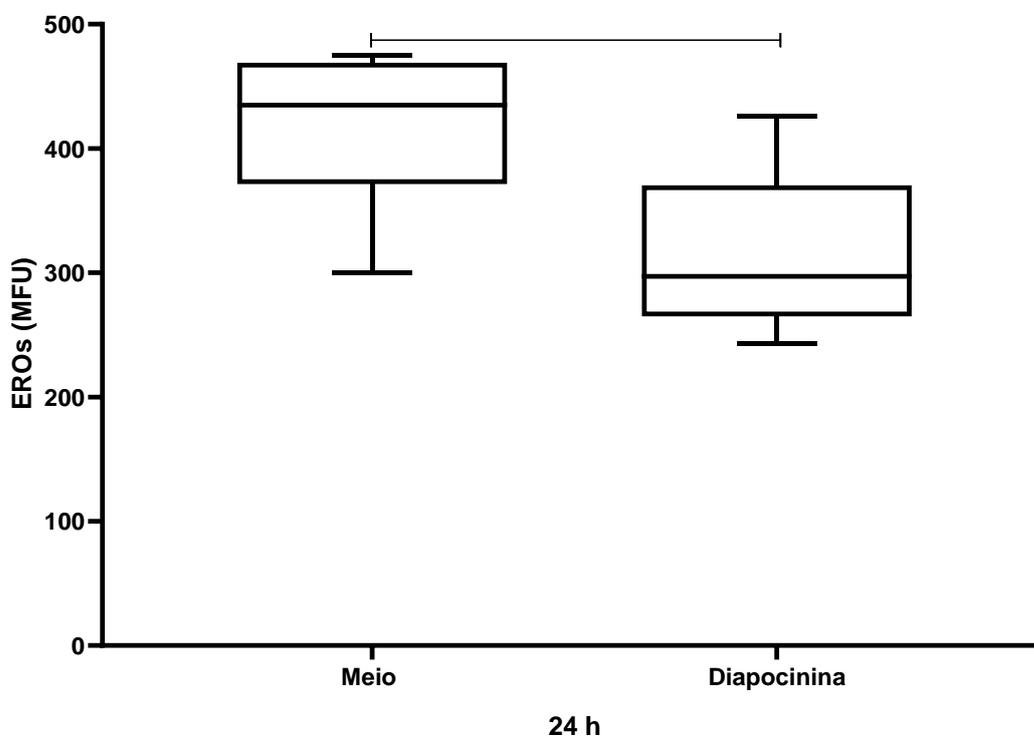


Figura 38: Influência do inibidor (Diapocinina) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Observamos menor produção de EROs pelos neuroblastos tratados ($p=0,0025$, Teste t). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

A adição do atazanavir na cultura não foi capaz de aumentar a produção de EROs pelos neuroblastos ($p < 0,05$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figura 39).

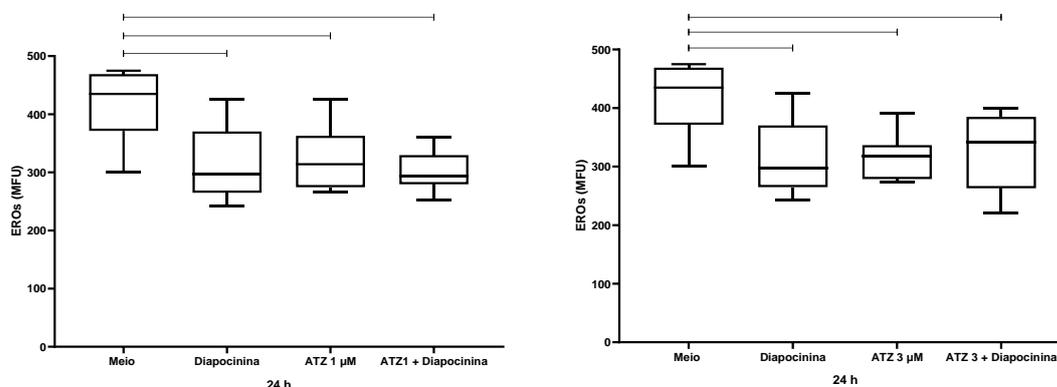


Figura 39: Influência do atazanavir (1 e 3 μM) na presença do inibidor (Diapocinina) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. O medicamento não foi capaz de aumentar a produção de EROs ($p < 0,05$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

O mesmo foi observado quando associado ao vírus (Figura 40).

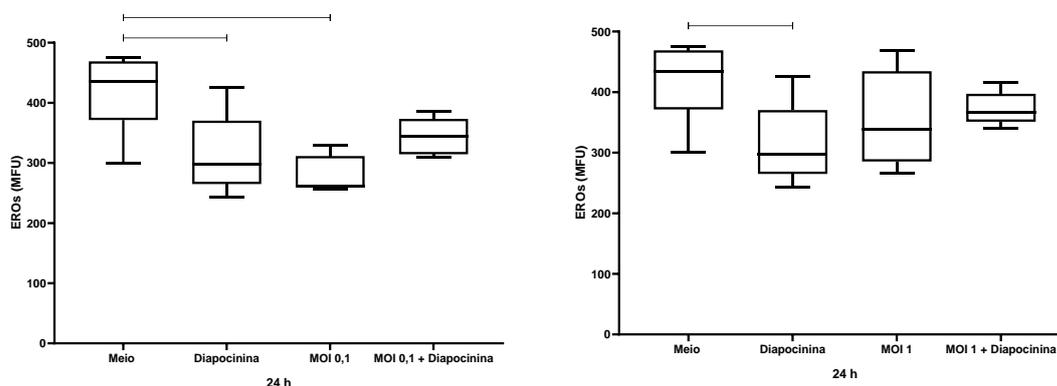


Figura 40: Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) e inibidor (Diapocinina) na produção de EROs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Não observamos diferença significativa nos grupos com o vírus Zika em ambas as proporções. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em síntese, houve redução de EROs na presença do vírus (MOI 0,1), e também na presença de ambas as concentrações do medicamento. O medicamento (1 e 3 μM) reverteu a queda de produção de EROs observada na infecção com MOI 0,1. Tanto o inibidor quanto o estímulo reduziram a produção de EROs.

5.10 Avaliação da produção de ERNs pelos neuroblastos

No intuito de melhor estudar os fatores envolvidos na produção de ERNs dos neuroblastos, as células foram incubadas por 3 horas com estímulo (LPS) e inibidor (APDC) da produção de espécies reativas de nitrogênio, e após 24 horas a leitura foi realizada em citômetro de fluxo. Ao avaliarmos a influência do vírus Zika na produção de ERNs, observamos menor produção de ERNs no grupo MOI 0,1 quando comparado aos neuroblastos não infectados (grupo Meio) ($p < 0,043$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey), sendo que a maior produção pelo grupo MOI 1 quando comparado ao MOI 0,1 ($p < 0,002$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) (Figura 41).

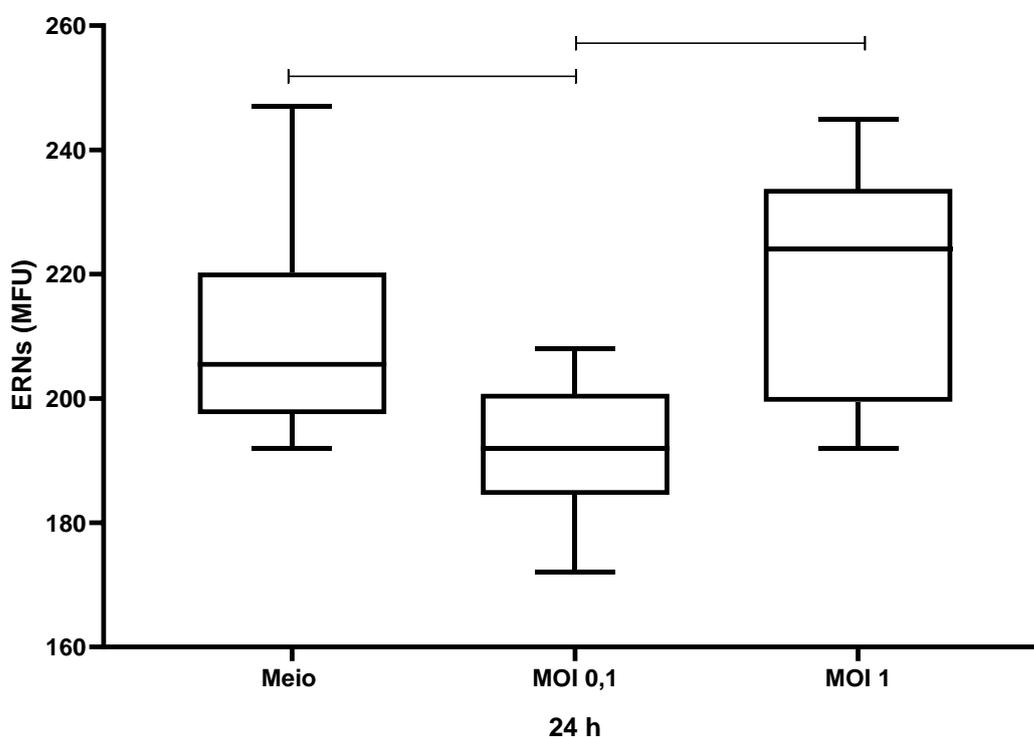


Figura 41: Influência do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Observamos menor produção de ERNs no grupo MOI 0,1 quando comparado ao grupo meio ($p < 0,043$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey) e maior produção pelo grupo MOI 1 quando comparado ao MOI 0,1 ($p < 0,002$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

O atazanavir não foi capaz de alterar a produção de ERNs pelos neuroblastos (Figura 42).

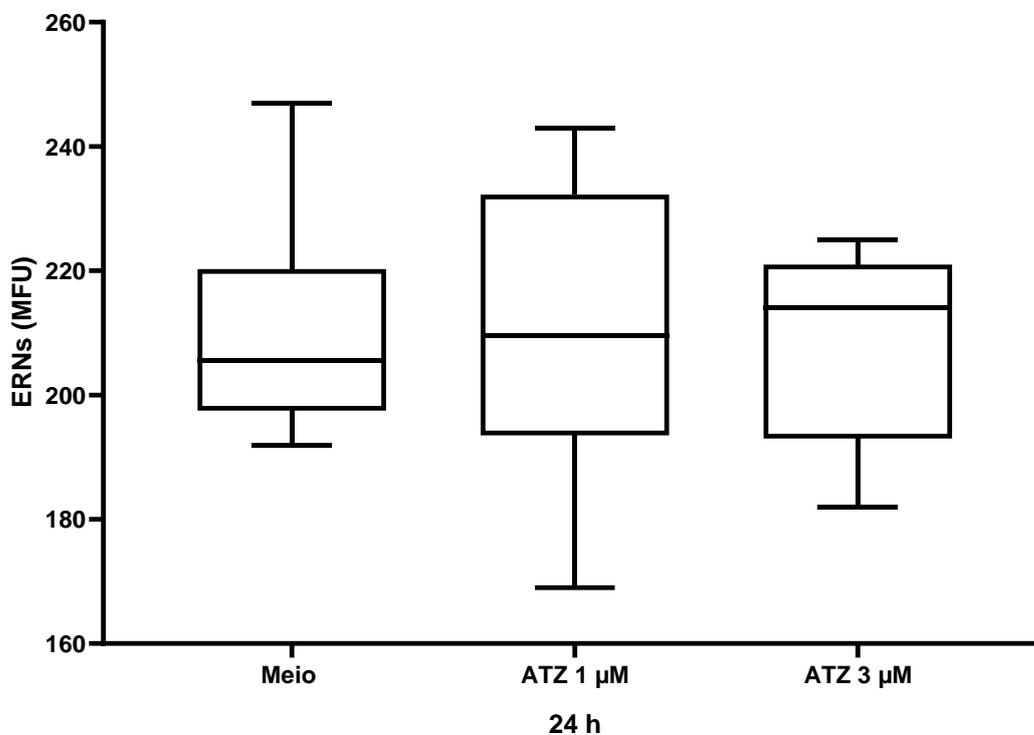


Figura 42: Influência do atazanavir (1 e 3 µM) na produção de ERNs dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. O atazanavir isoladamente em ambas as concentrações não foi capaz de alterar a produção de ERNs. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao associarmos o medicamento com o vírus Zika (MOI 0,1), não observamos diferenças significativas. O mesmo foi observado quando aumentamos a proporção do medicamento (3 µM) (Figura 43).

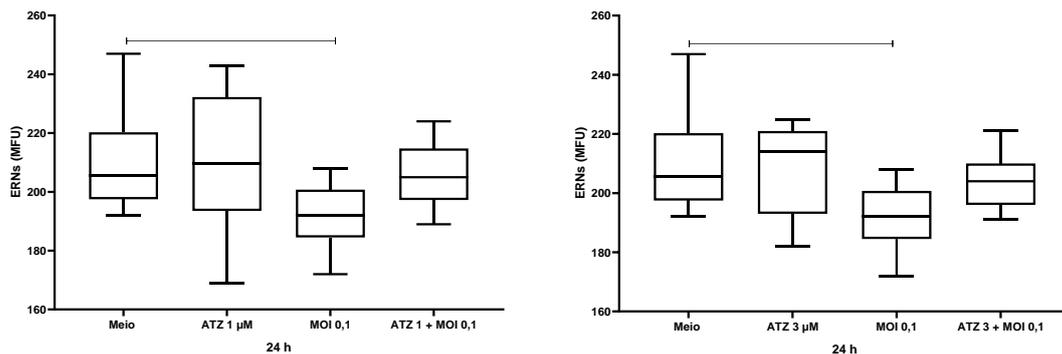


Figura 43: Influência do vírus Zika (MOI 0,1) e do atazanavir (1 µM) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Observamos menor produção de ERNs no grupo MOI 0,1 quando comparado ao grupo meio ($p < 0,043$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Não observamos diferença significativa quando aumentamos a proporção do vírus Zika (MOI 1) para a proporção 1 µM do atazanavir. Também não observamos significância estatística quando a proporção do medicamento foi maior (3 µM) (Figura 44).

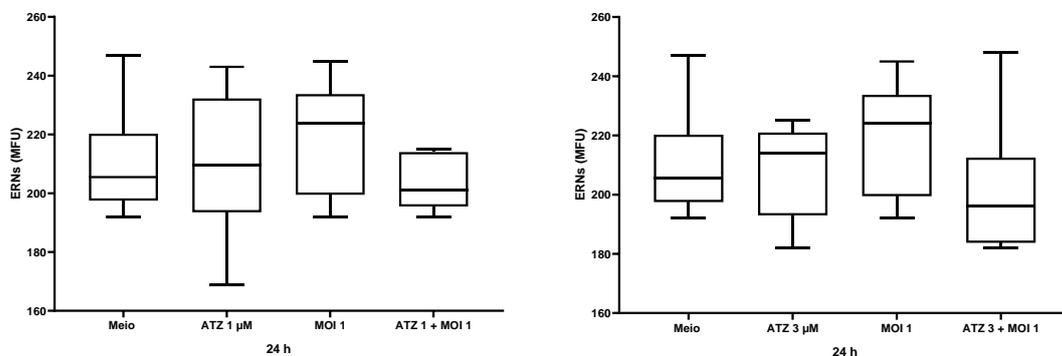


Figura 44: Influência do vírus Zika (MOI 1) e do atazanavir (1 µM) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Não observamos significância estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando administramos o indutor de ERNs não observamos diferença estatística entre os grupos (Figura 45).

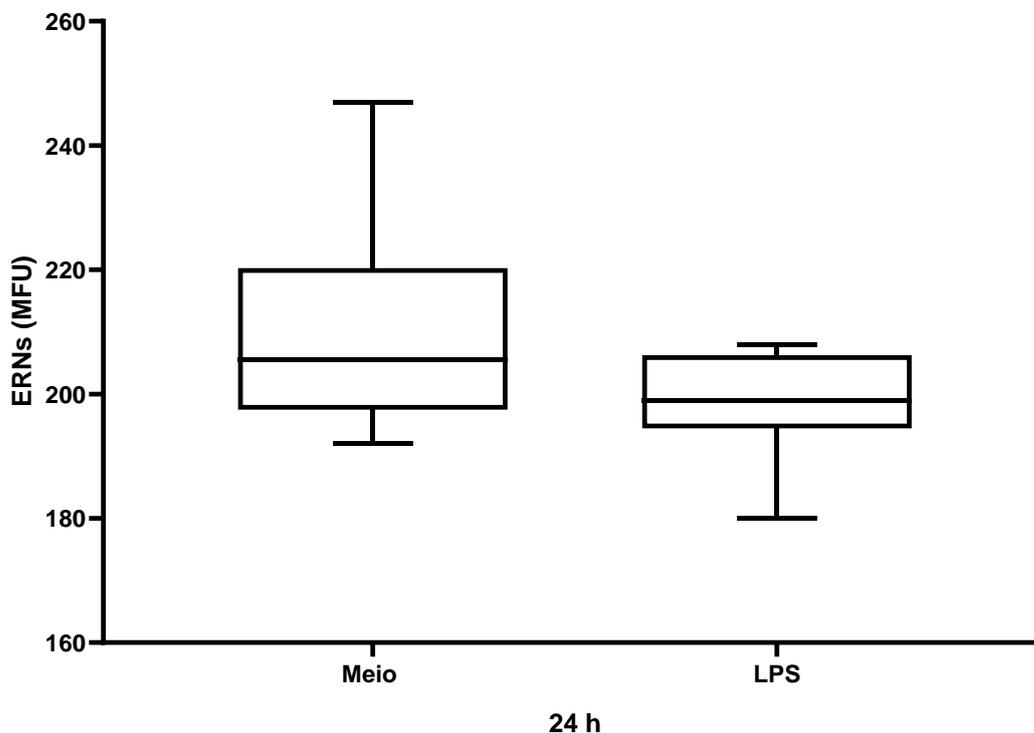


Figura 45: Influência do indutor (LPS) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Não observamos diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Também não observamos diferença estatística ao associar o indutor com o medicamento (Figura 46).

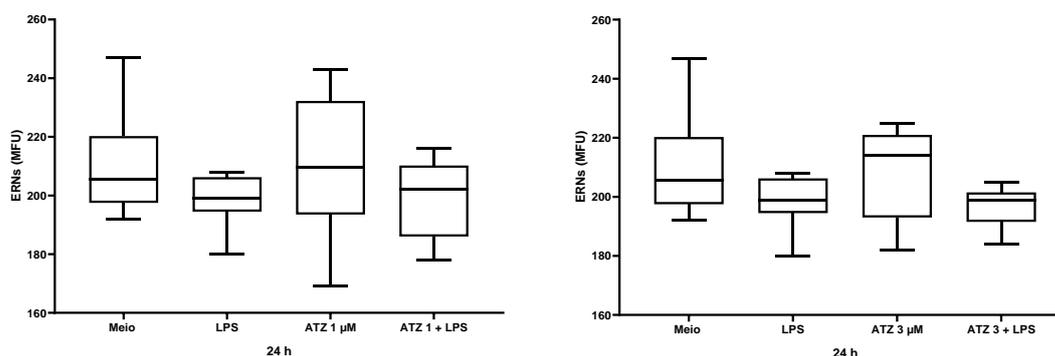


Figura 46: Influência do indutor (LPS) e do atazanavir (1 e 3 µM) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Não observamos diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

O vírus Zika na proporção 0,1 MOI aumentou a produção de ERNs na presença do indutor (Figura 47).

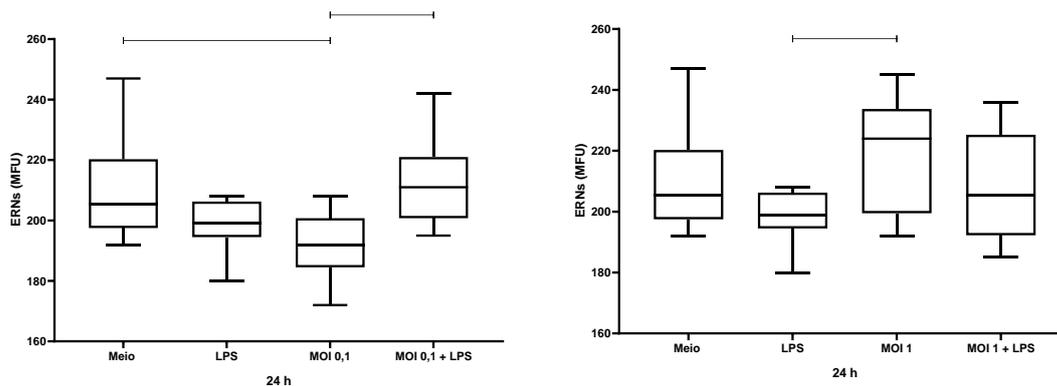


Figura 47: Influência do indutor (LPS) e do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Observamos aumento na produção de ERNs no grupo com o indutor e o vírus na proporção 0,1 MOI ($p < 0,0045$, ANOVA seguido do método de comparação de Tukey), entretanto, o mesmo não foi observado na maior proporção do vírus. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Observamos que não houve diferença estatística na produção de ERNs na presença do inibidor (Figura 48).

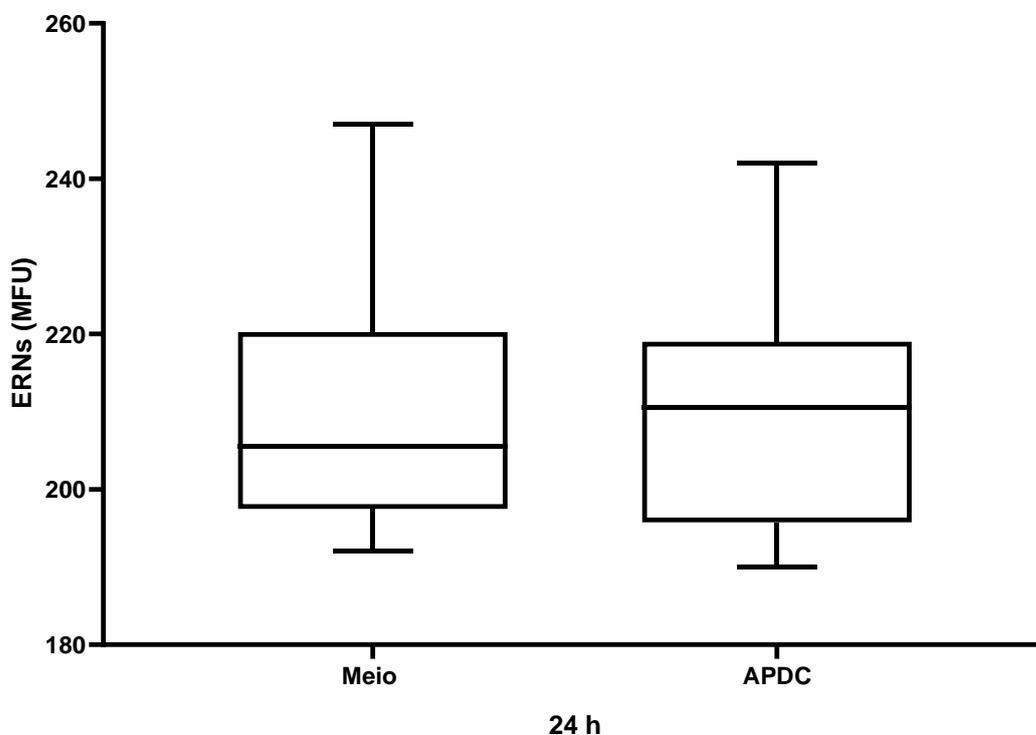


Figura 48: Influência do inibidor (APDC) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Não observamos diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao associar o medicamento com o inibidor, não observamos diferença estatística na produção de ERNs pelos neuroblastos (Figura 49).

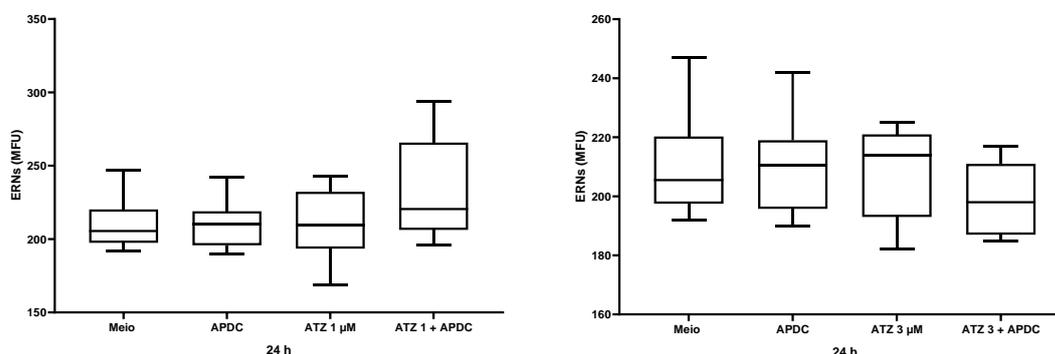


Figura 49: Influência do inibidor (APDC) e do atazanavir (1 e 3 µM) na produção de ERNs dos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Não observamos diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando associado ao vírus Zika não observamos influência significativa do inibidor na produção de ERNs (Figura 50).

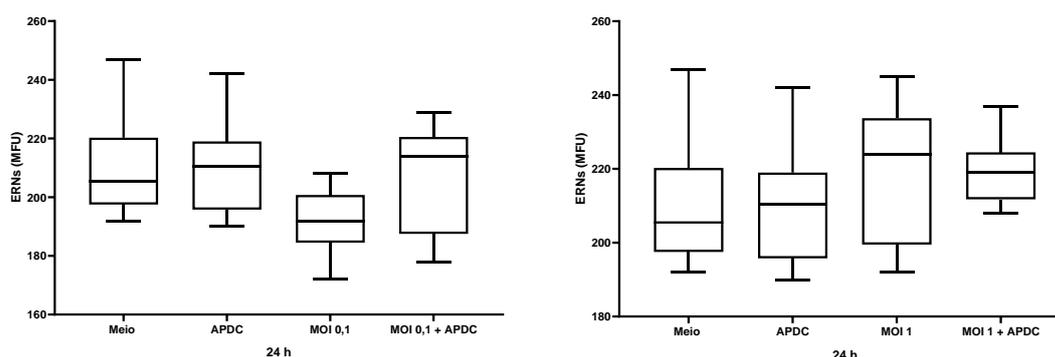


Figura 50: Influência do inibidor (APDC) e do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) na produção de ERNs pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação foi realizada por sonda e lida em citometria de fluxo. Não observamos significância estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em síntese, houve redução de ERNs na presença do vírus (MOI 0,1). O medicamento (1 e 3 µM) não alterou a produção.

5.11 Influência da infecção pelo vírus Zika e do tratamento com atazanavir sobre a produção de citocinas

- IL-1β

Para verificar o efeito da infecção pelo vírus Zika na produção de IL-1 pelos neuroblastos foi feita a determinação da citocina no sobrenadante das

culturas após 24 horas de incubação com 0,1 MOI e 1 MOI do vírus Zika. Observamos que a infecção dos neuroblastos aumentou a produção da IL-1 para a concentração de 1 MOI do vírus Zika (medianas: de 1,385 para 2,600; $p=0,0363$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 51).

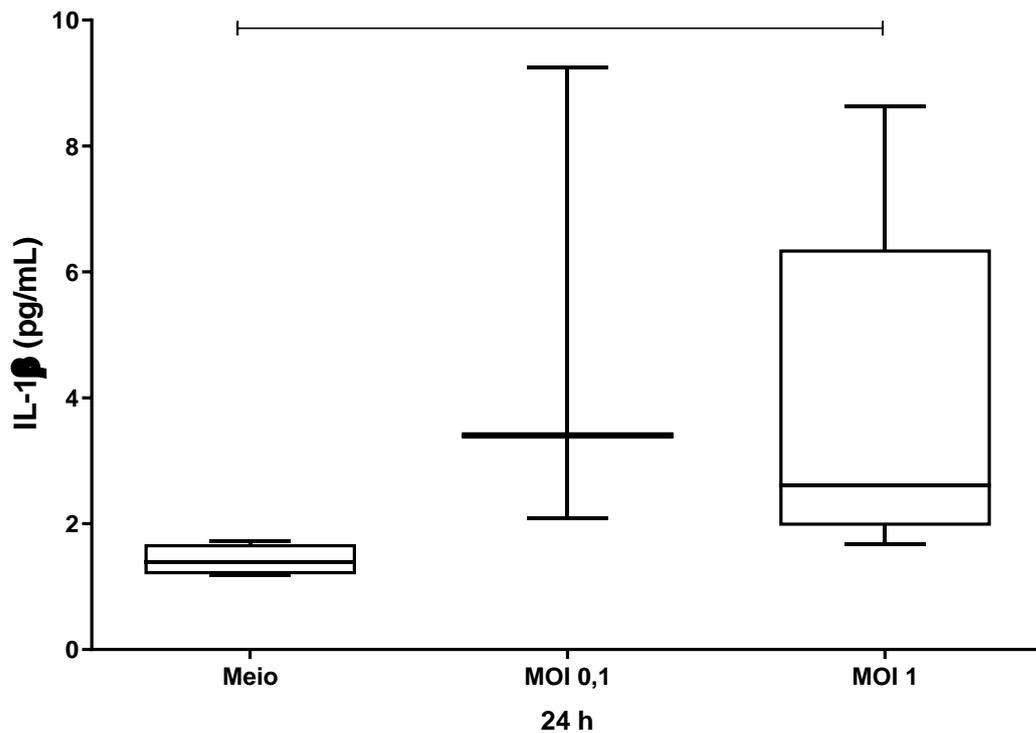


Figura 51: Influência do vírus Zika nas proporções de 0,1 e 1 MOI sobre a produção de IL-1 β pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-1 β foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve maior produção da IL-1 β na presença do MOI 1 quando comparado ao grupo Meio ($n=5$) ($p=0,0363$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Com o objetivo de verificar se o atazanavir (1 e 3 μM) modificaria a concentração da citocina, o medicamento foi administrado nas culturas de neuroblasto e após 24h o sobrenadante foi utilizado para leitura através de kit CBA em citometria de fluxo. Não foi observado diferença significativa (Figura 52).

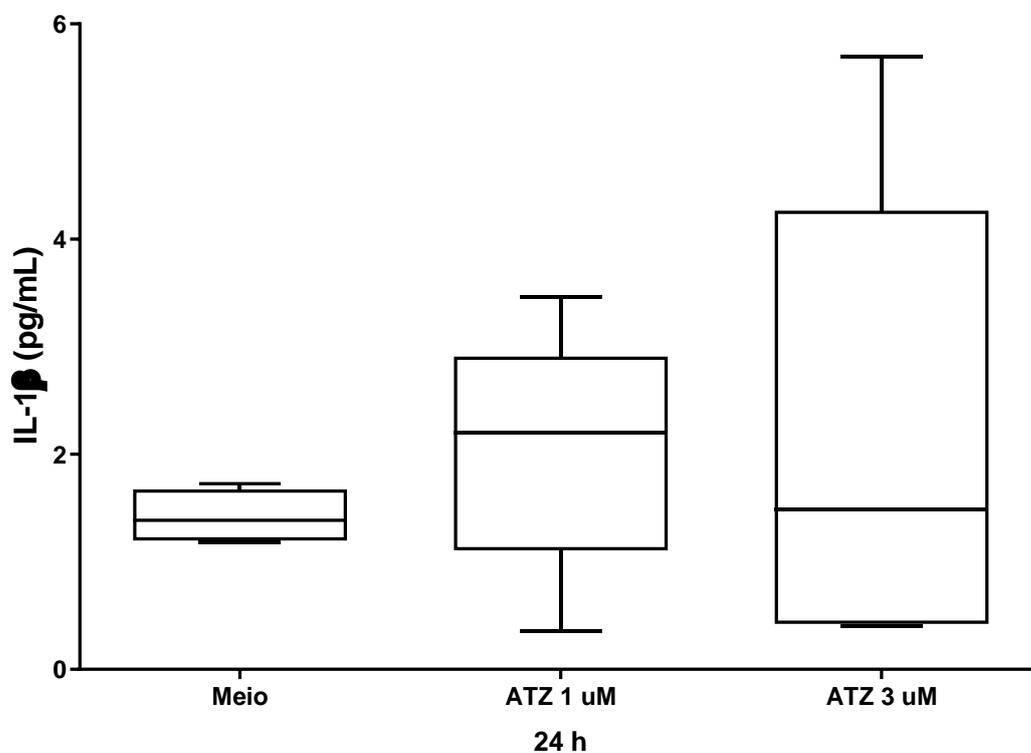


Figura 52: Influência do Atazanavir (1 e 3 μM) sobre a produção de IL-1 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-1 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,6498$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Não houve diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Com o objetivo de verificar se o atazanavir (1 e 3 μM) modificaria a concentração da citocina, o medicamento foi administrado nas culturas de

neuroblasto e após 24h em cultura, a determinação da IL-1 β foi feita no sobrenadante da cultura, utilizando kit CBA por citometria de fluxo. O atazanavir não modificou a produção da IL-1 β pelos neuroblastos, pois não foi observado diferença significativa entre os grupos (Figura 53).

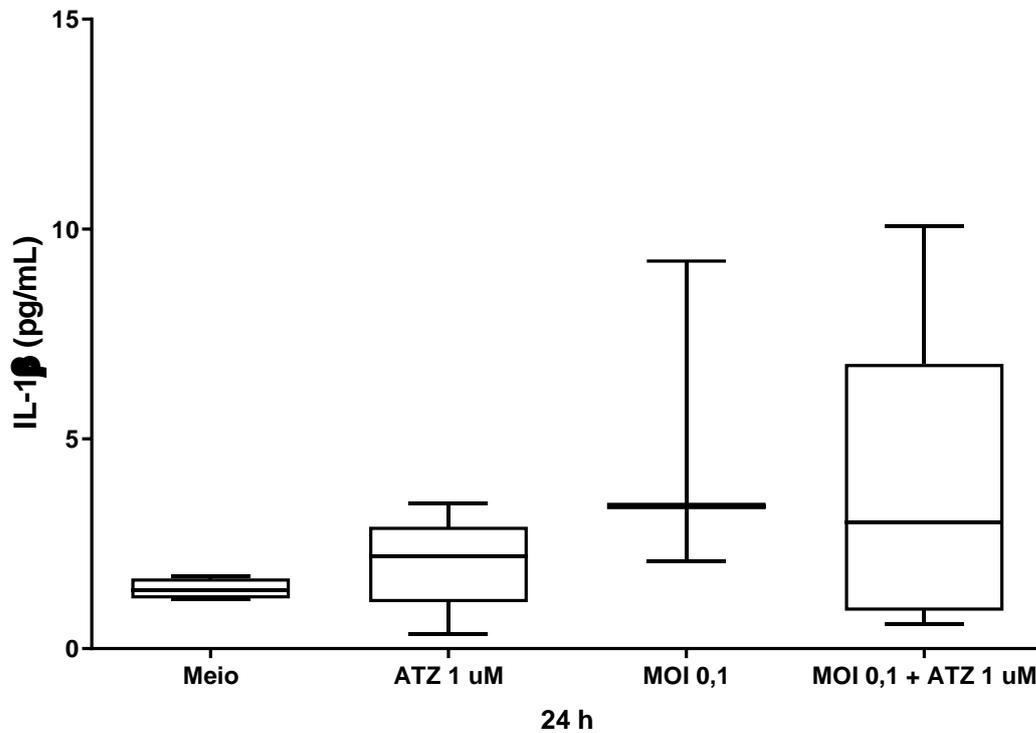


Figura 53: Influência do atazanavir (1 e 3 μ M) sobre a produção de IL-1 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-1 foi feita por citometria de fluxo utilizando kit CBA. (n=5) ($p=0,6498$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Não houve diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Entretanto, observamos que quando utilizado na concentração de 3 μ M, o atazanavir foi capaz de reduzir a concentração de IL-1 β ($p=0,0421$, Kruskal-

Wallis seguido do método de comparação de Dunn. Medianas: 3,4 e 0,59) (Figura 54).

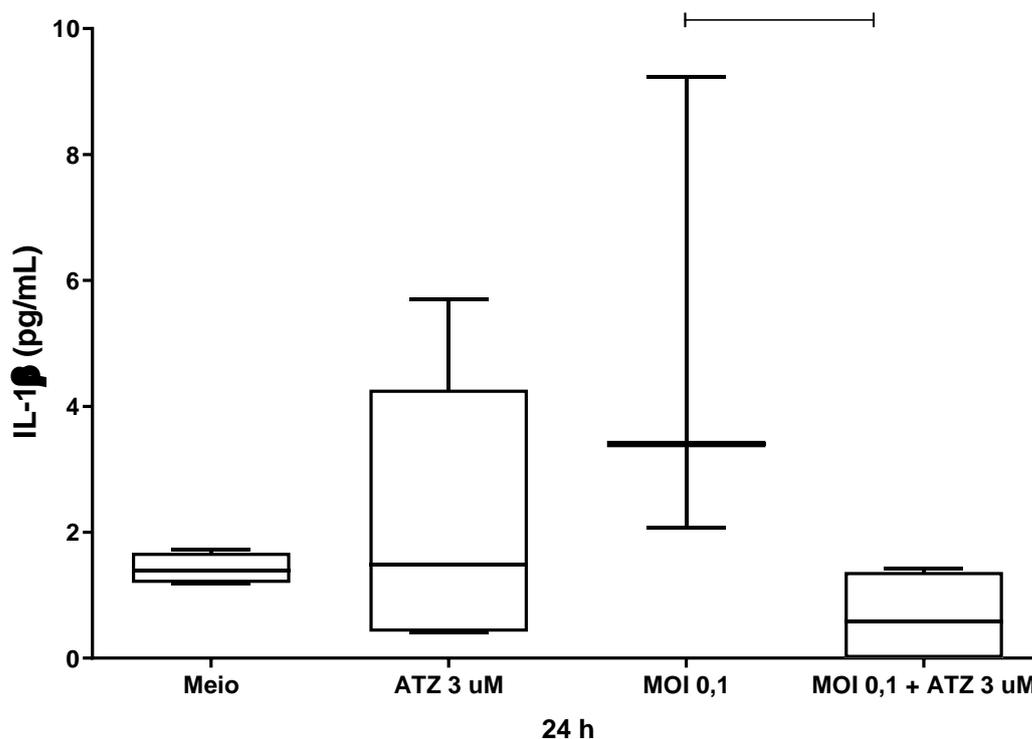


Figura 54: Influência do ATZ 3 x MOI 0,1 sobre a produção de IL-1 β pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-1 β foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve redução na produção da citocina no grupo ATZ 3 + MOI 0,1 comparado com o MOI 0,1, (n=5) (p=0,0421, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao aumentar a proporção de vírus Zika (MOI 1), também não foi observado diferença estatística na presença do Atazanavir 1 μ M (Figura 55).

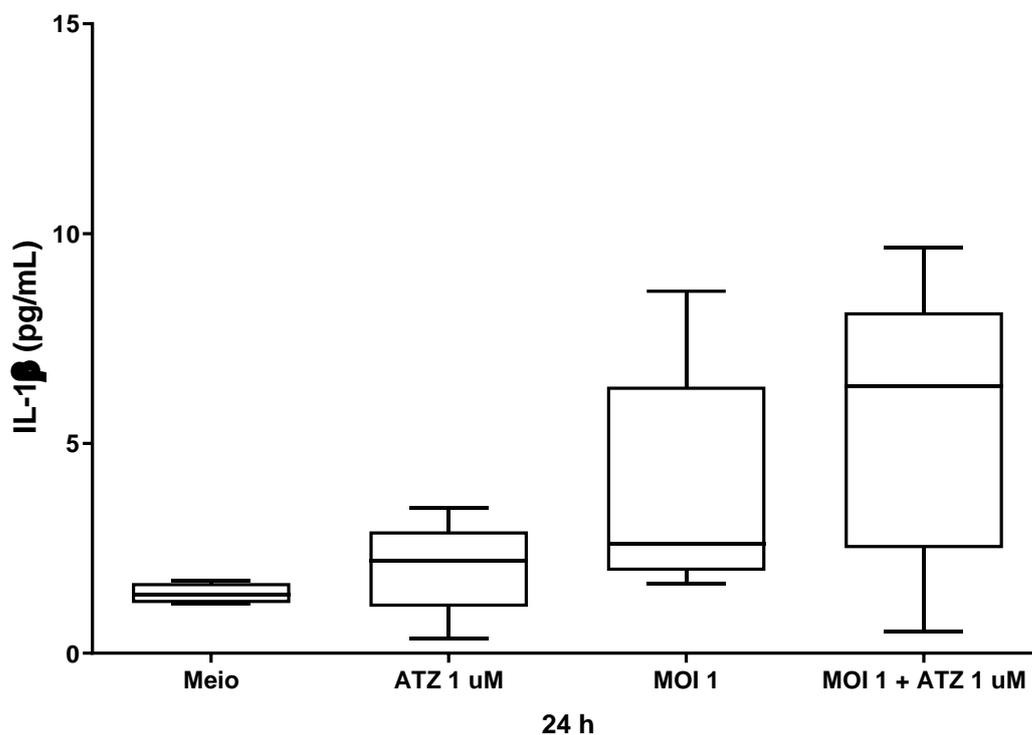


Figura 55: Influência do ATZ 1 x MOI 1 sobre a produção de IL-1 β pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-1 β foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) (p=0,2564, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Não houve diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Já para a concentração de 3 μ M do atazanavir na presença da infecção pelo vírus Zika utilizando o MOI 1, observou um padrão semelhante ao visto na proporção MOI 0,1 ao comparar MOI 1 x MOI 1 + ATZ 3, porém, foi apenas uma

tendência estatística ($p=0,055$, teste de Mann-Whitney, medianas: 2,600 e 1,180) (Figura 56).

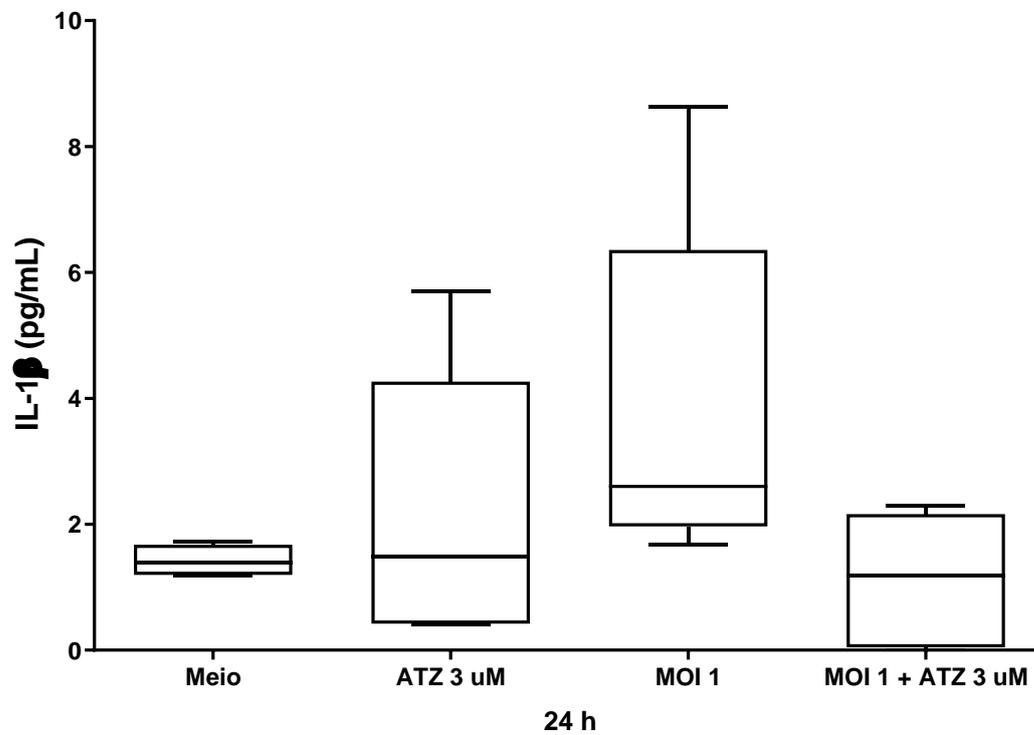


Figura 56: Influência do ATZ 3 x MOI 1 sobre a produção de IL-1 β pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-1 β foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve uma tendência estatística para a redução da citocina no grupo MOI 1 + ATZ 3 comparado com o MOI 1 ($n=5$) ($p=0,055$, teste Mann-Whitney). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Por se tratar de uma citocina inflamatória, foi avaliado se a inibição do ERNs pelo APDC alteraria a produção da IL-1 β . Interessantemente, verificamos que a inibição de das espécies reativas de oxigênio, pela presença do inibidor, aumentou a produção da citocina ($p=0,0159$, teste Mann-Whitney, medianas: 1,385 e 2,385) (Figura 57).

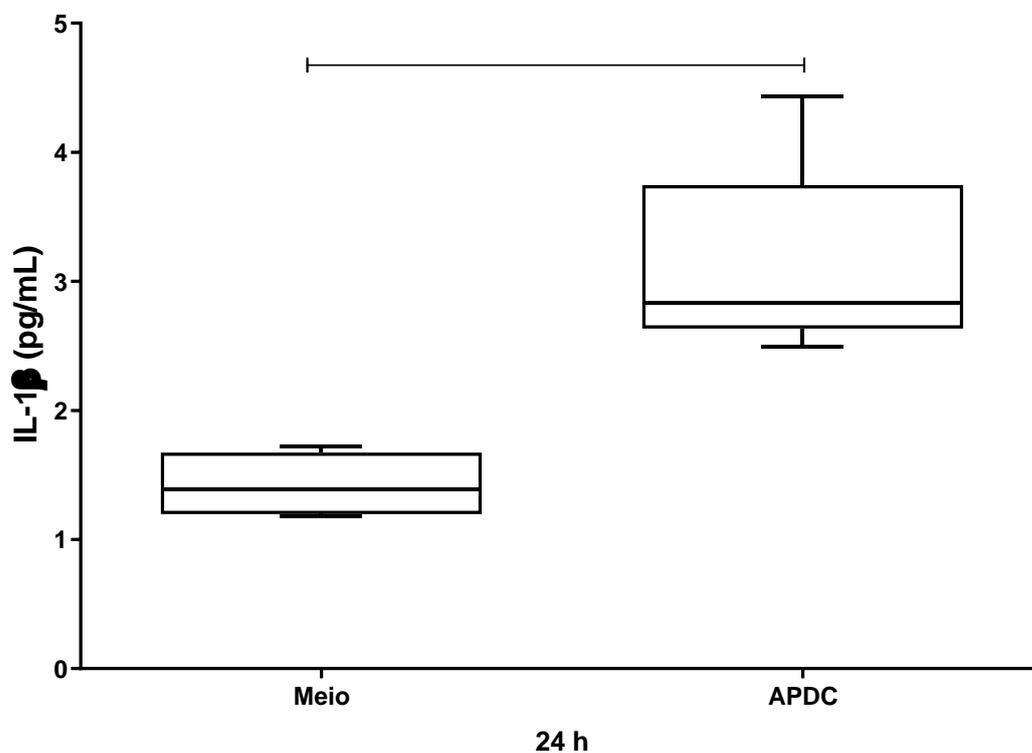


Figura 57: Influência do APDC sobre a produção de IL-1 β pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-1 β foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Foi observado um aumento na produção da citocina por influência do APDC ($n=5$) ($p=0,0159$, teste Mann-Whitney). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Para verificar se pela inibição das espécies reativas de oxigênio, pelo tratamento com APDC alteraria a produção da IL- β pelos neuroblastos induzida pelo-vírus Zika, o inibidor foi incubado por 3 horas com os neuroblastos, em seguida o vírus foi adsorvido por 1 hora, e então incubados por mais 24 horas, sendo que a IL-1 β foi determinada no sobrenadante das culturas por citometria de fluxo. Observamos que na proporção MOI 0,1 na presença do inibidor APDC, a produção da IL- β foi menor quando comparada com o grupo APDC ($p=0,0171$, ANOVA seguido do teste de Tukey) (Figura 58).

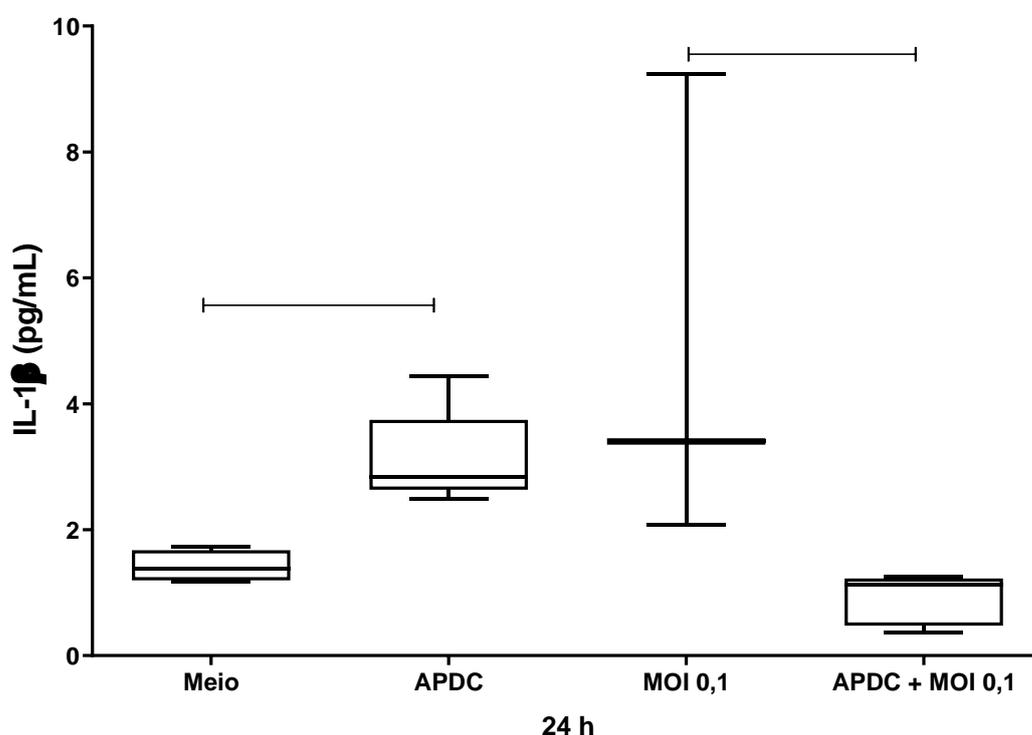


Figura 58: Influência do MOI 0,1 + APDC sobre a produção de IL-1 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-1 β foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Foi observado um aumento na produção da citocina por influência do APDC ($n=5$) ($p=0,0171$, ANOVA seguido do teste de Tukey), também foi observado uma diminuição na produção da IL-1 no grupo APDC + MOI 0,1 quando comparado ao MOI 0,1 ($p=0,0171$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Verificamos que a inibição da produção de espécies reativas de nitrogênio pelo tratamento dos neuroblastos por 3 h com diapocinina não modificou a produção da IL-1 β (Figura 59).

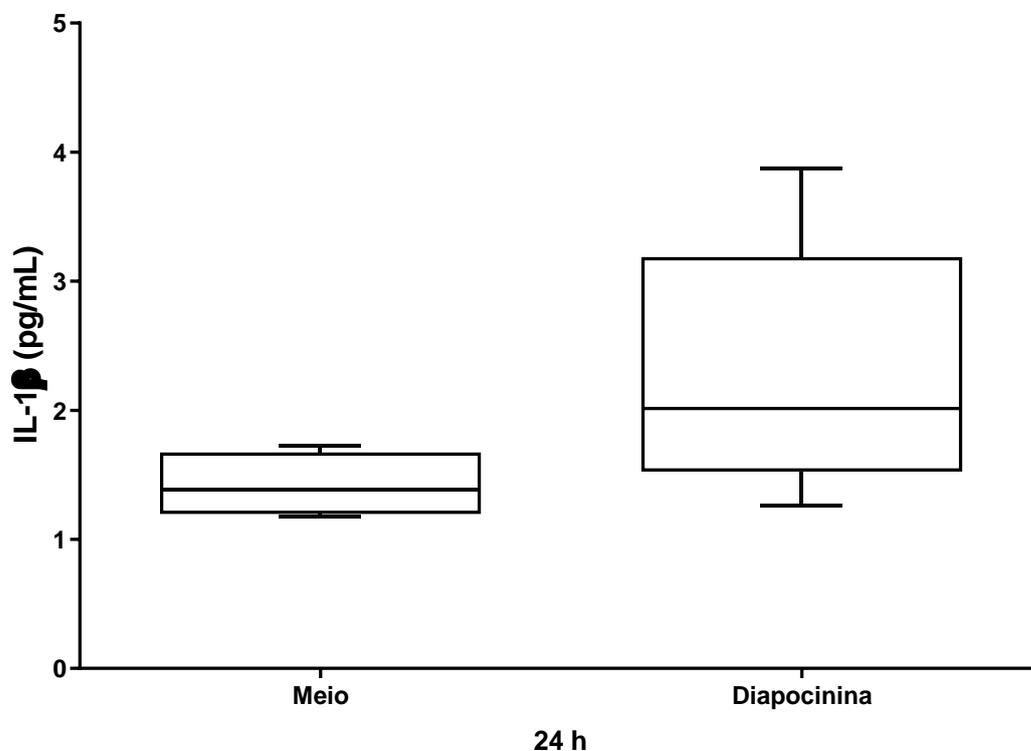


Figura 59: Influência da diapocinina sobre a produção de IL-1 β pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-1 β foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Não houve diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em síntese, houve maior produção de IL-1 na presença do vírus no MOI 1. A inibição da via de ERNs por APDC aumentou a produção da citocina, e essa produção foi reduzida quando associada ao vírus na proporção 0,1.

- **TNF**

Outra importante citocina inflamatória avaliada foi o TNF. Interessantemente, o padrão observado foi semelhante ao da IL-1 β . Na presença da infecção pelo vírus Zika com MOI 1 houve aumento da concentração da citocina quando comparado com os grupos MOI 0,1 e Meio ($p < 0,0001$, ANOVA seguido do teste de Tukey) (Figura 60).

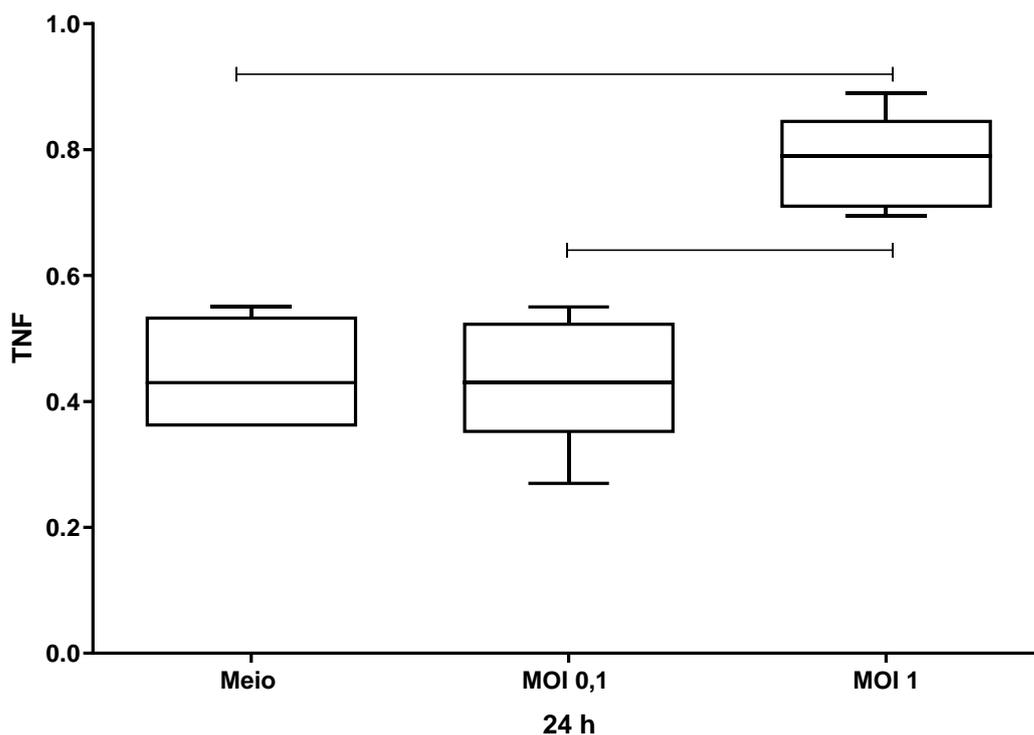


Figura 60: Influência do vírus Zika nas proporções de 0,1 e 1 sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação do TNF foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve aumento da produção da citocina no grupo MOI 1 quando comparado aos dois outros grupos ($n=5$) ($p<0,0001$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Para avaliar se o Atazanavir alteraria a produção de TNF, o medicamento foi incubado por 24 horas em ambas as concentrações (1 e 3 μM) com o neuroblasto e em seguida o sobrenadante foi avaliado em citometria de fluxo. Não observamos diferença estatística entre os grupos (Figura 61).

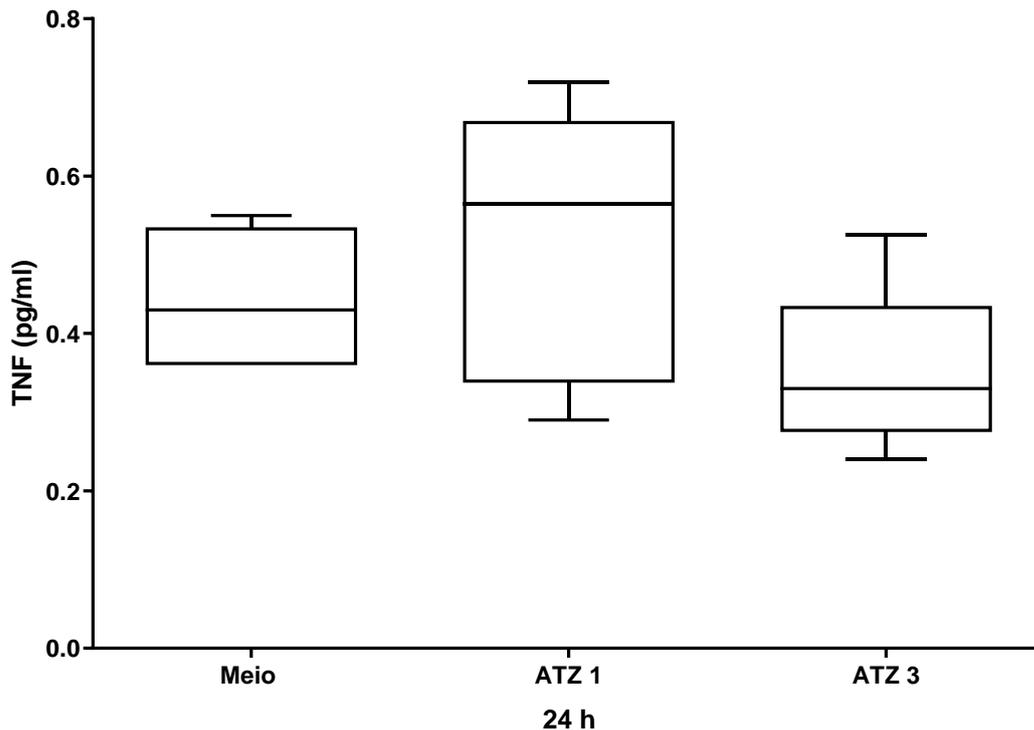


Figura 61: Influência do atazanavir nas concentrações de 1 e 3 μM sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da TNF foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,1667$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Não houve diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Com o objetivo de avaliar se o atazanavir influenciaria a produção de TNF na presença da infecção por vírus Zika (MOI 0,1 e 1), foi administrado o medicamento e após incubação de 24 horas a concentração do TNF foi avaliada no sobrenadante por citometria de fluxo. Não foi observado diferença significativa na concentração de 1 μM x MOI 0,1 (Figura 62).

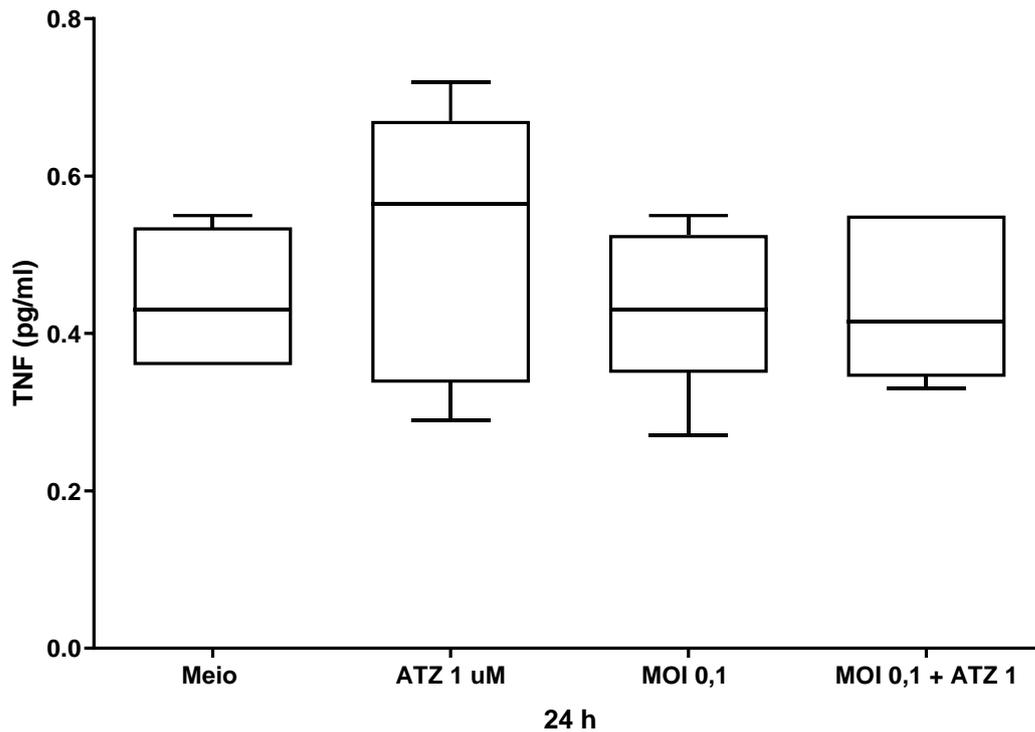


Figura 62: Influência do atazanavir na concentração de 1 μM sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 MOI do vírus Zika. A determinação da TNF foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,7034$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

O mesmo padrão foi observado na para o medicamento (3 μM) na proporção MOI 0,1 (Figura 63).

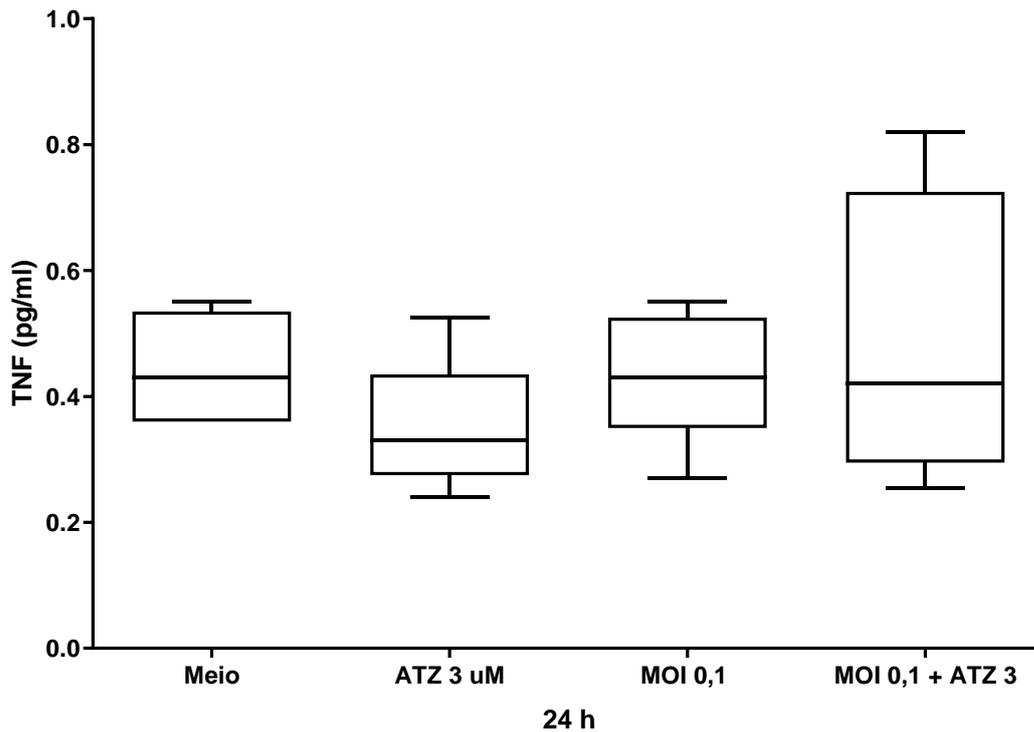


Figura 63: Influência do atazanavir na concentração de 3 μM sobre a produção de TNF pelos neuroblastos incubados por 24h em cultura com 0,1 do vírus Zika. A determinação da TNF foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,4928$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando avaliado o efeito do atazanavir na concentração de 1 μM na proporção MOI 1 de infecção do vírus Zika, observamos efeito imunomodulador do atazanavir. O atazanavir diminuiu a concentração do TNF de 0,79 para 0,24 pg/mL ($p=0,0020$, ANOVA seguido do teste de Tukey) (Figura 64).

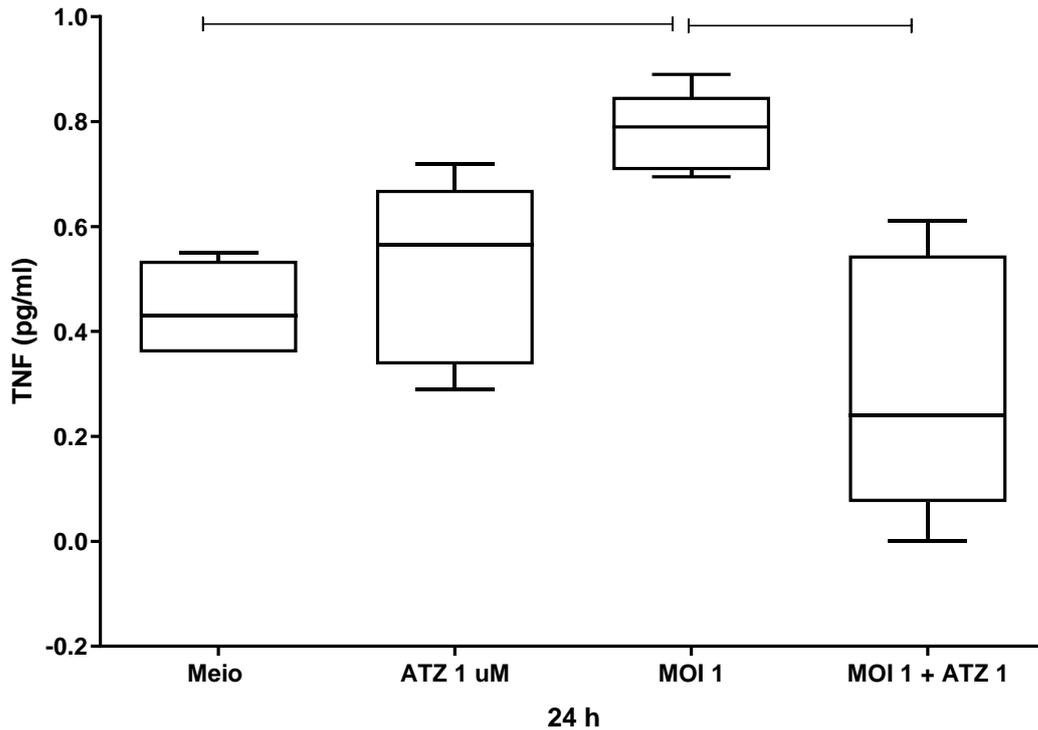


Figura 64: Influência do atazanavir na concentração de 1 μM sobre a produção de TNF pelos neuroblastos incubados em cultura por 24h com 1 MOI do vírus Zika. A determinação da TNF foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve redução na produção da citocina por influência do Atazanavir 1 μM na presença da infecção na proporção MOI 1, observa-se também o aumento da produção na presença da infecção quando comparado com o controle. ($n=5$) ($p=0,0020$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Interessantemente, o mesmo padrão imunomodulador foi observado na concentração 3 μM do Atazanavir na presença da infecção na proporção MOI 1 ($p=0,0004$, ANOVA seguido do teste de Tukey, medianas: 0,79 e 0,24) (Figura 65).

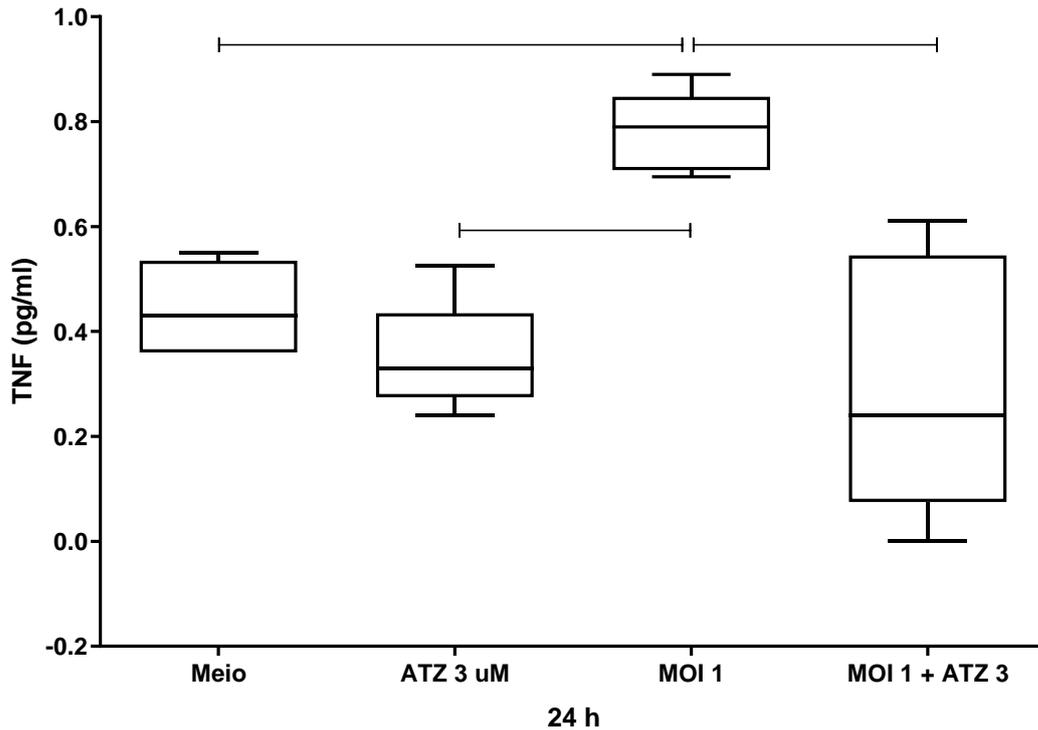


Figura 65: Influência do atazanaver sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika. A determinação da TNF foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve redução na produção da citocina por influência do atazanavir (3 μ M) na presença da infecção na proporção MOI 1. Observa-se também o aumento da produção na presença da infecção quando comparado com o controle. ($n=5$) ($p=0,0004$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Para avaliar se a inibição de EROs influenciaria a produção de TNF, foi utilizado o inibidor APDC por 3 horas, e depois as células foram incubadas por 24 horas, para então o sobrenadante ser utilizado para determinação da citocina por citometria de fluxo. Não foi observado diferença estatística (Figura 66).

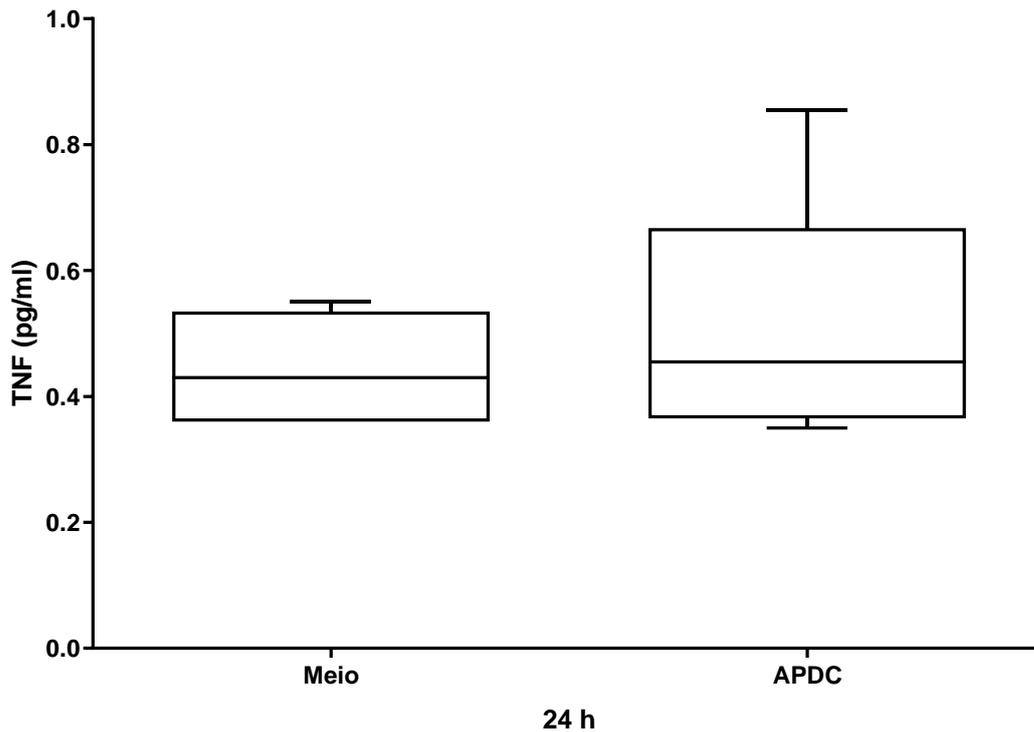


Figura 66: Influência do APDC sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da TNF foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) ($p=0,9524$, teste de Mann-Whitney). Não houve diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao avaliar se a inibição de ERNs reduziria a produção do TNF pelos neuroblastos, utilizamos o inibidor diapocinina por 3 horas, e depois as células foram incubadas por 24 horas para então o sobrenadante ser utilizado na determinação da citocina por citometria de fluxo. Não foi observado diferença estatística entre os grupos (Figura 67).

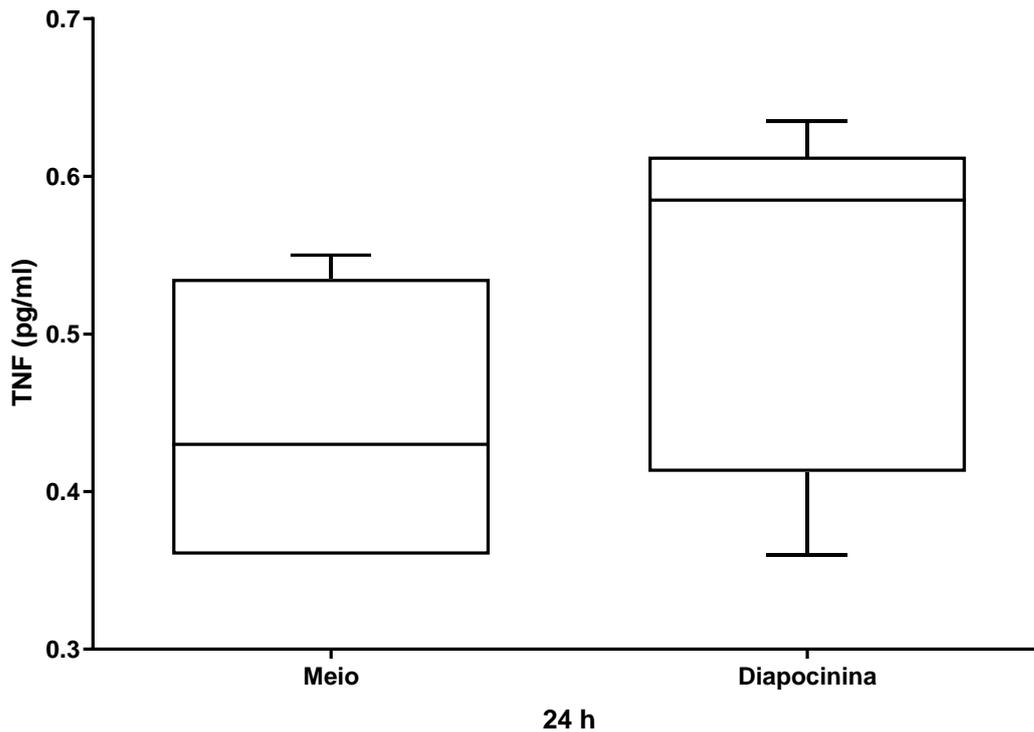


Figura 67: Influência da diapocinina sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da TNF foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) (p=0,2312, teste t). Não houve diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Observamos significância estatística somente quando houve associação da diapocinina com a proporção MOI 1 do vírus Zika (p=0,0023, ANOVA seguido do teste de Tukey, medianas: 0,79 e 0,56) (Figura 68).

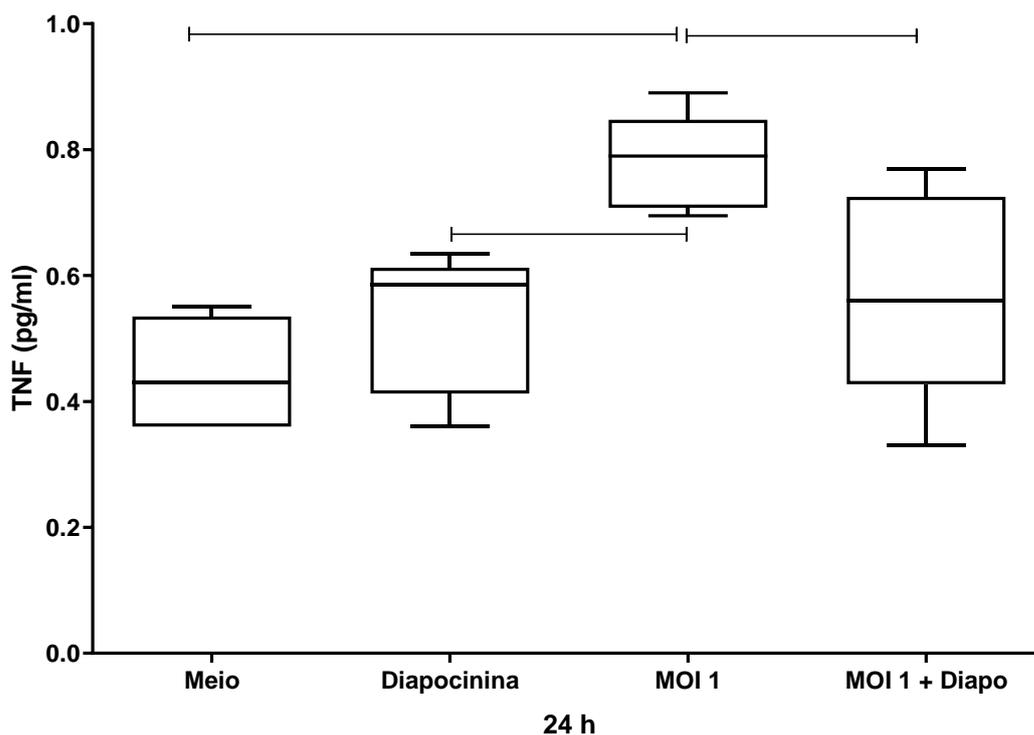


Figura 68: Influência da diapocinina sobre a produção de TNF pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 Moi do vírus Zika. A determinação da TNF foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve redução da produção de TNF na associação de diapocinina com o vírus Zika MOI 1, observa-se também aumento da produção da citocina no MOI 1 quando comparado com os outros grupos (n=5) ($p=0,0023$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em síntese, houve maior produção de TNF na presença do vírus MOI 1, o atazanavir em ambas proporções reduziu a concentração da citocina na presença do vírus MOI 1.

- **IL-6**

Para verificar o efeito da infecção pelo vírus Zika na produção de IL-6 pelos neuroblastos foi feita a determinação da citocina no sobrenadante das culturas após 24 horas de incubação com 0,1 MOI e 1 MOI do vírus Zika. Observamos que não houve diferença estatística quando comparados os grupos (Figura 69).

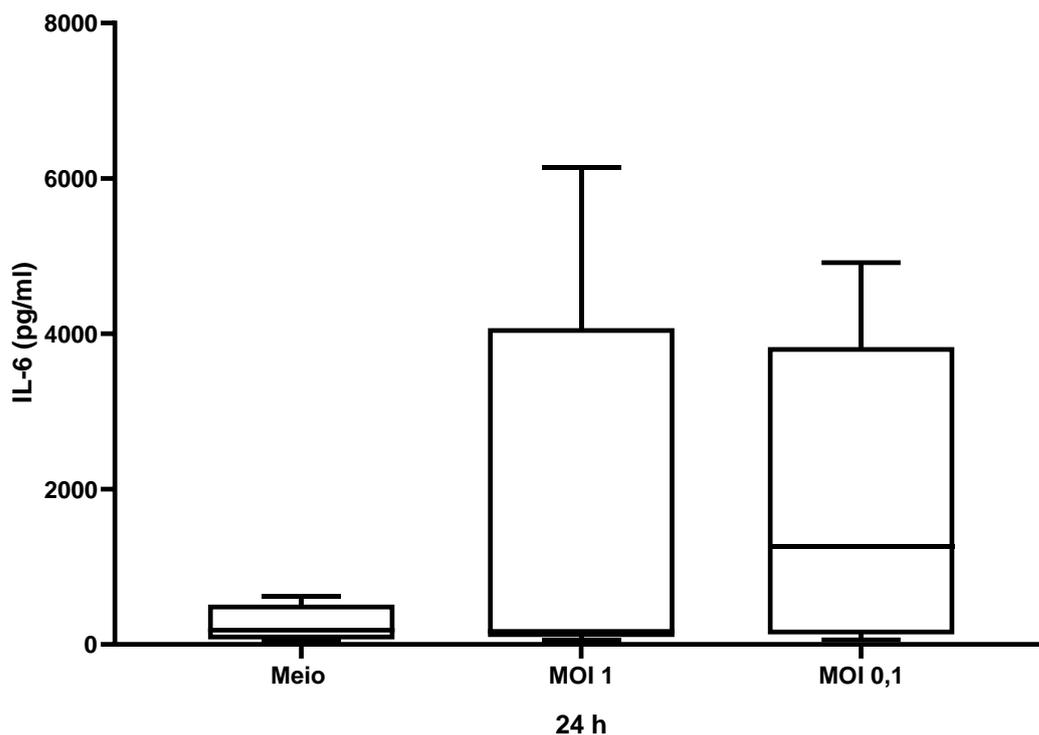


Figura 69: Influência do vírus Zika nas proporções de 0,1 e 1 MOI sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-6 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Não houve diferença estatística ($n=5$) ($p=0,3867$, ANOVA seguido do método de comparação múltiplas de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Para avaliar se o medicamento atazanavir alterou a produção de IL-6 pelos neuroblastos, os neuroblastos foram incubados com duas concentrações (1 e 3 μM) da droga, e após 24 horas os sobrenadantes das culturas foram

avaliados para a IL-6 por kit CBA. Não observamos diferença estatística na produção da IL-6 entre os grupos (Figura 70)

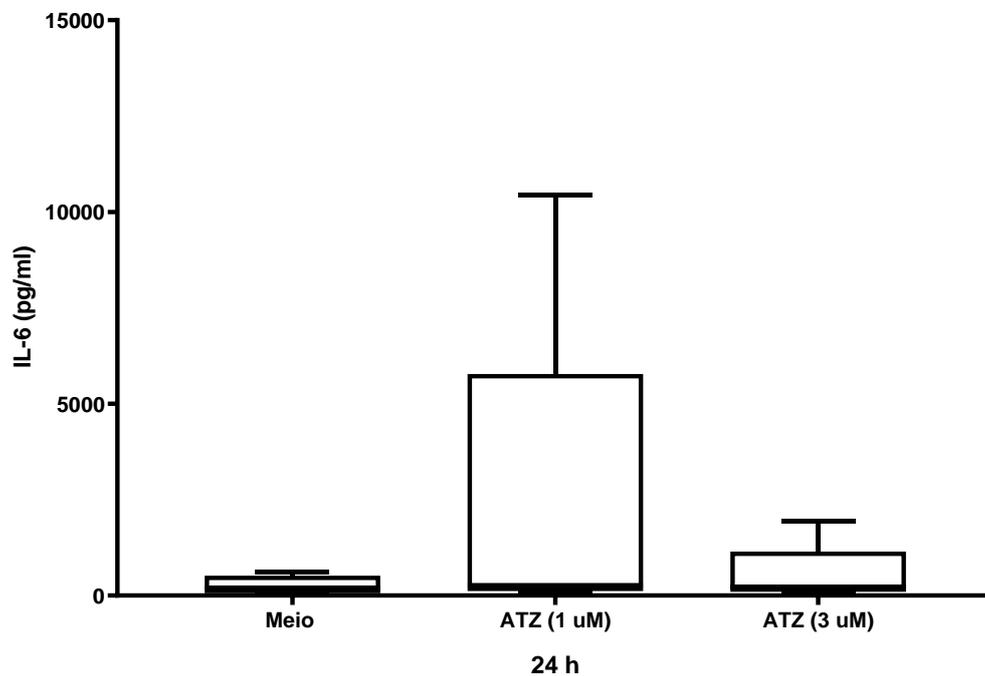


Figura 70: Influência do atazanavir nas concentrações de 1 e 3 μM sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-6 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Não houve diferença estatística entre os grupos ($n=5$) ($p=0,6808$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos

Quando houve o tratamento das células na concentração de 1 μM , na presença do vírus Zika na proporção MOI 0,1, também não foi observado diferença estatística (Figura 71).

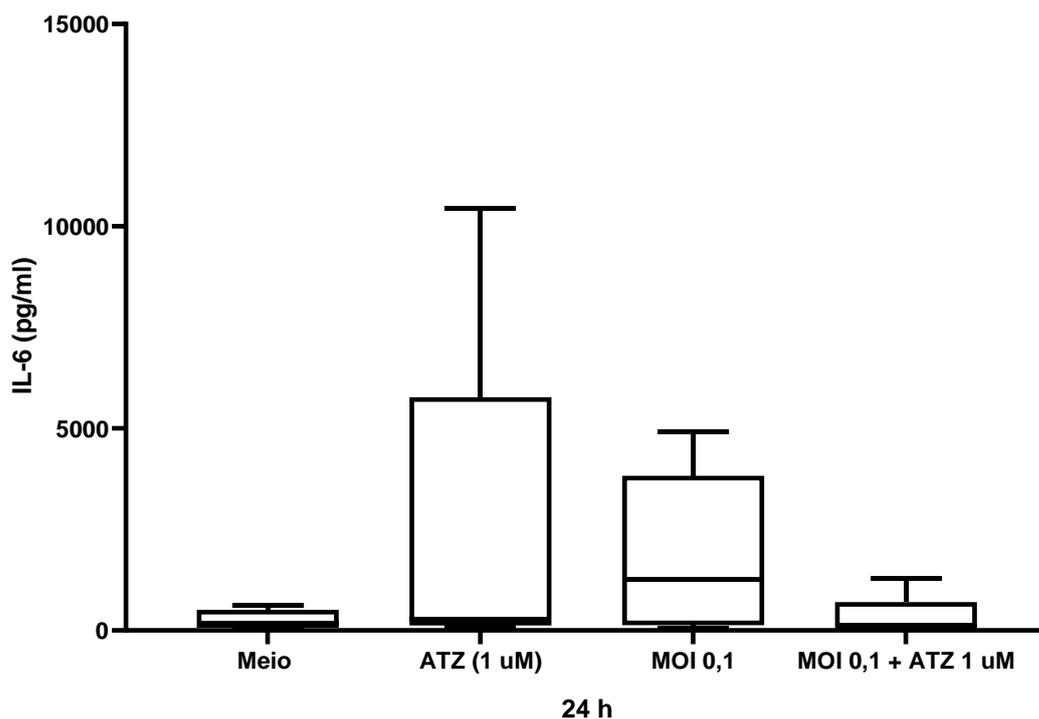


Figura 71: Influência do atazanavir ($1\mu\text{M}$) sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h, na presença de 0,1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-6 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Não houve diferença estatística entre os grupos ($n=5$) ($p=0,3710$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Entretanto, quando a concentração do medicamento foi aumentada para $3\mu\text{M}$, observamos que o atazanavir diminuiu a produção da IL-6 pelos neuroblastos. Houve diferença estatística entre o grupo MOI 0,1 e o grupo MOI 0,1 + ATZ 3 ($p=0,0171$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn) (Figura 72).

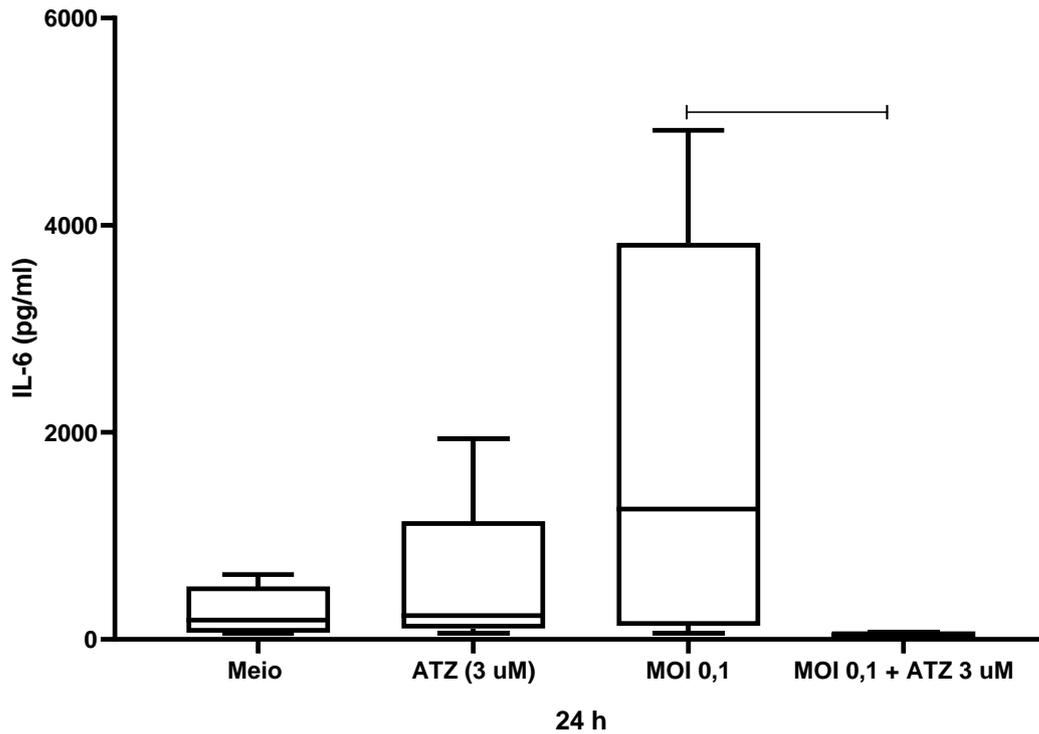


Figura 72: Influência do atazanavir (3 μM) e do vírus Zika (MOI 0,1) sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-6 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve diferença estatística quando comparados os grupos MOI 0,1 e MOI 0,1 + ATZ 3 ($n=5$) ($p=0,0171$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Porém, a diferença não foi significativa quando avaliada na proporção do 1 MOI do vírus Zika em ambas as concentrações do medicamento (Figura 73 e

74).

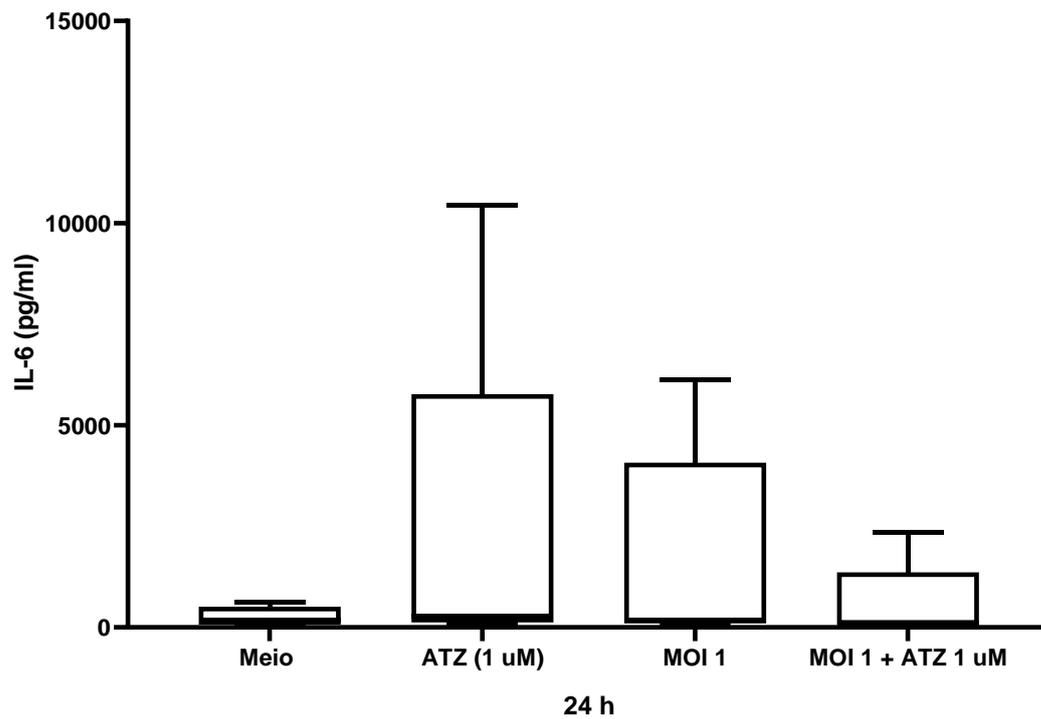


Figura 73: Influência do atazanavir ($1 \mu\text{M}$) sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 Moi do vírus Zika. A determinação da IL-6 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Não houve diferença estatística entre os grupos ($n=5$) ($p=0,6790$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

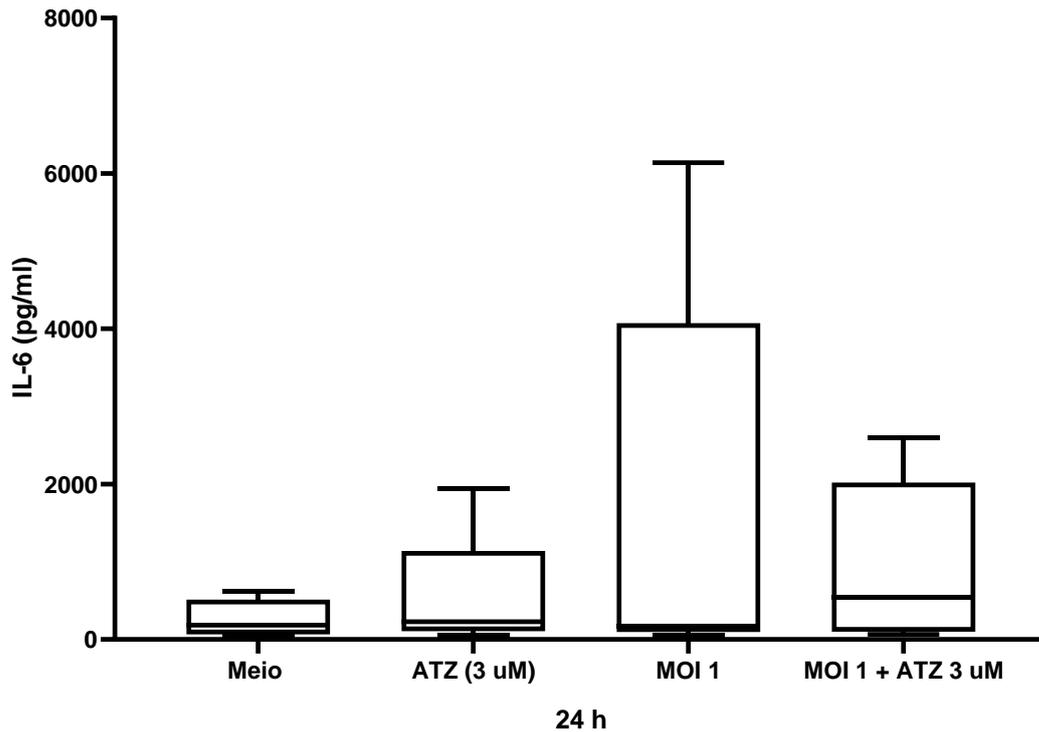


Figura 74: Influência do atazanavir (3 μ M) sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-6 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Não houve diferença estatística entre os grupos ($n=5$) ($p=0,8536$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

No intuito de verificar a influência da presença de espécies reativas de oxigênio na produção da IL-6, as células foram incubadas por 3 horas com o

inibidor de EROS APDC, e então seguiram para o procedimento padrão de incubação de 24 horas. Na presença do APDC, não foi observada diferença estatística entre os grupos (Figura 75).

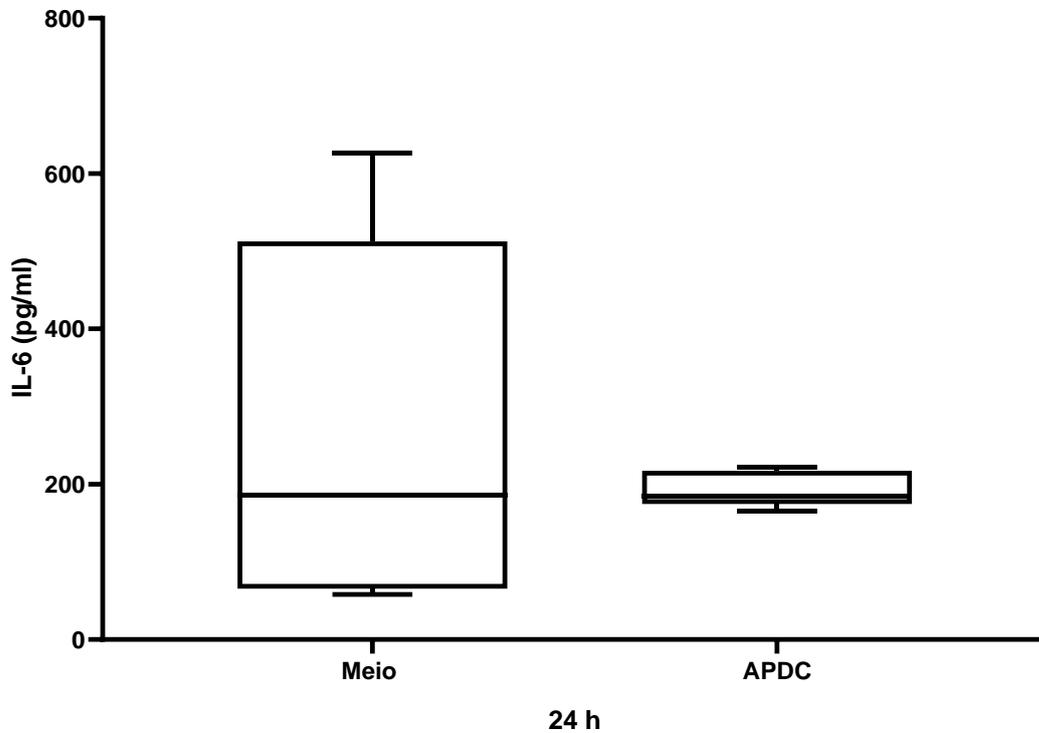


Figura 75: Influência da inibição de espécies reativas de oxigênio pelo APDC sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-12 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) (p=0,5111, teste t). Não houve diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

O mesmo foi observado quando na incubação por 3 horas foi utilizado o inibidor da produção espécies reativas de nitrogênio diapocinina (Figura 76).

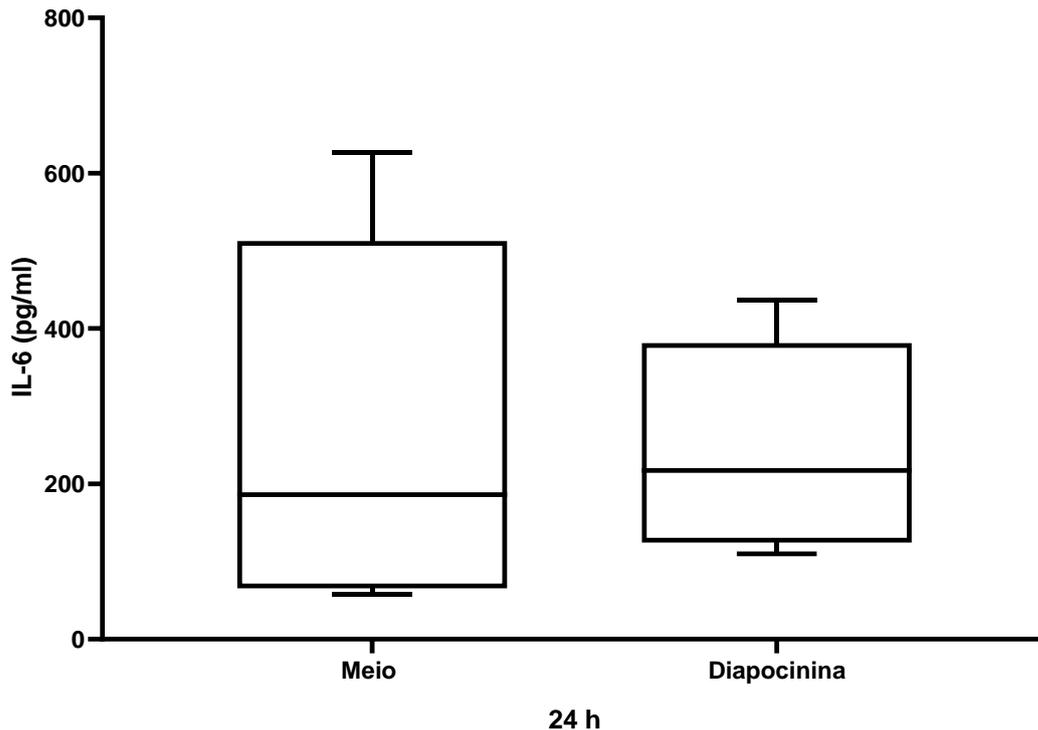


Figura 76: Influência da Diapocinina sobre a produção de IL-6 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-6 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) (p=0,8586, teste t). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

- **IL-12p70**

Com o objetivo de verificar o efeito da infecção pelo vírus Zika na produção de IL-12p70 pelos neuroblastos foi feita a determinação da citocina no sobrenadante das culturas após 24 horas de incubação com 0,1 MOI e 1 MOI do vírus Zika. Observamos que a infecção dos neuroblastos diminuiu a produção da IL-12p70 para a concentração de 1 MOI do vírus Zika (medianas: de 0,8450 para 0,3425; p=0,0043, ANOVA seguido pelo teste de Tukey). Entretanto, embora houvesse uma pequena diminuição da produção da IL-12 p70 quando utilizamos 0,1 MOI do vírus Zika, a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 77).

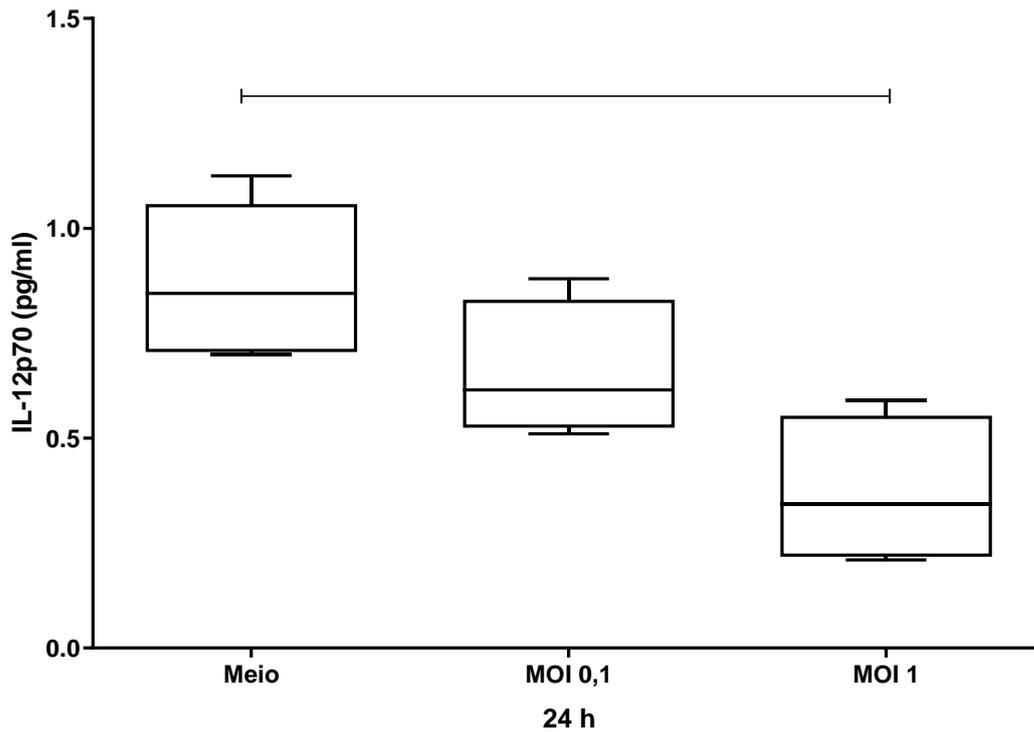


Figura 77: Influência do vírus Zika nas proporções de 0,1 e 1 MOI sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-12 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) ($p=0,0043$, ANOVA seguido do teste de Tukey; Zika MOI 1 < meio). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

No intuito de verificar se o atazanavir alterava a produção de IL-12p70, os neuroblastos foram incubados por 24 horas com duas concentrações do medicamento (1 e 3 μM). Não foi observada diferença estatística, em ambas as concentrações do atazanavir (Figura 78).

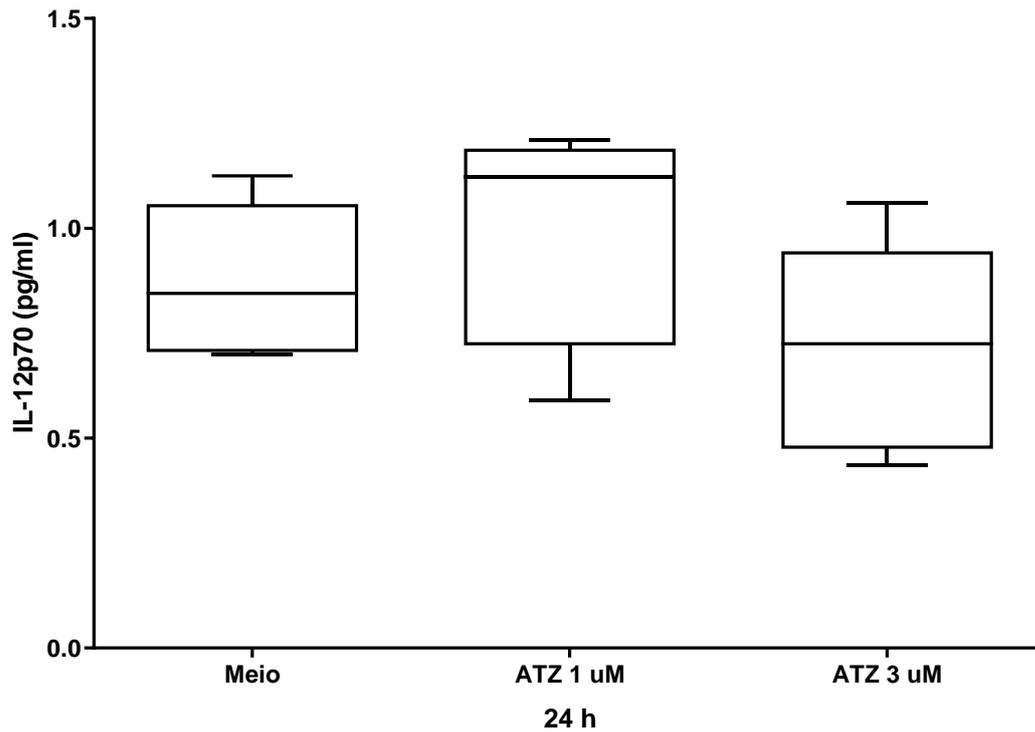


Figura 78: Influência do atazanavir nas concentrações de 1 e 3 μM sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-12 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,21$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Para avaliar se o atazanavir influenciaria a produção da IL-12p70 na presença do vírus, o medicamento foi incubado por 24h em ambas as concentrações (1 e 3 μM) com as duas proporções (0,1 e 1 MOI) do vírus Zika. Não foi observada diferença estatística quando o atazanavir (1 μM) foi acrescentado às culturas na presença de MOI 0,1 do vírus Zika (Figura 79).

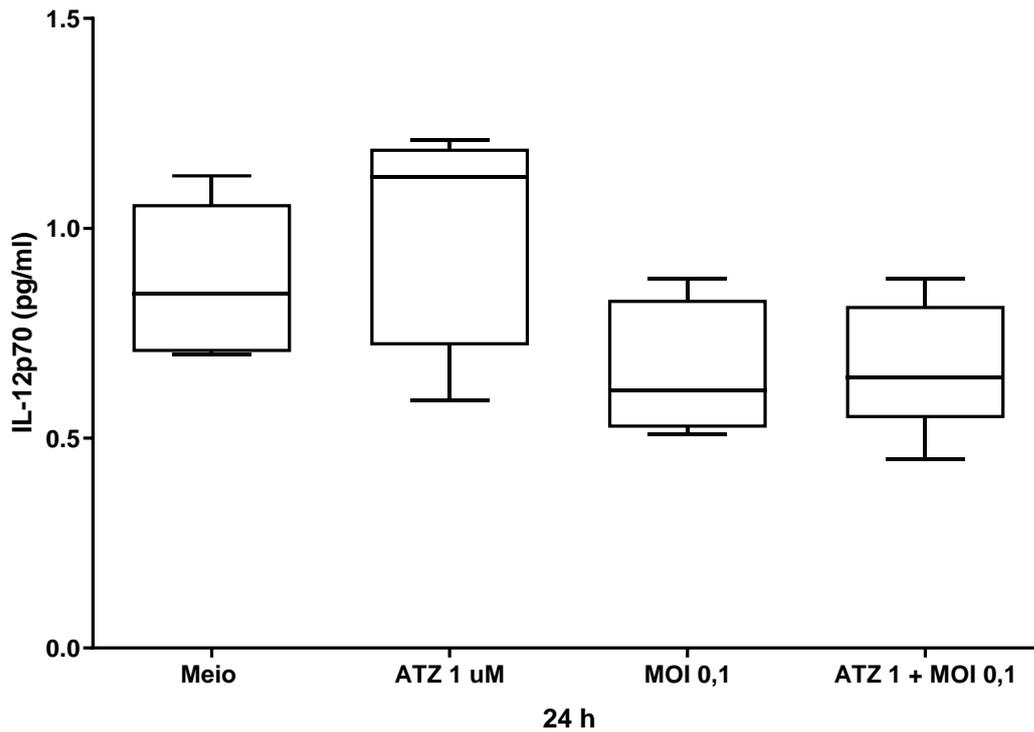


Figura 79: Influência do atazanavir (1 μ M) sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-12p70 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) ($p=0,1351$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Também não foi observada diferença estatística quando administrado o medicamento na concentração de 3 μ M na presença do vírus com o MOI 0,1 (Figura 80).

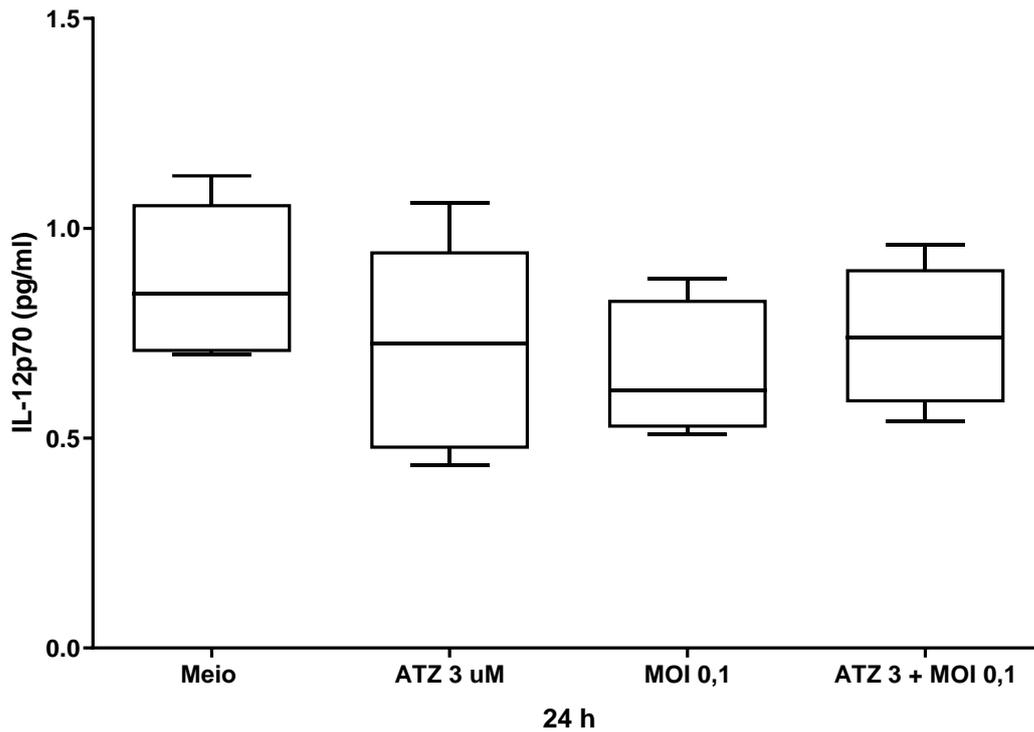


Figura 80: Influência do atazanavir (3 μ M) sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-12p70 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) (p=0,3895, ANOVA seguido do teste de Tukey). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando os neuroblastos foram incubados com o 1 MOI do vírus Zika, observamos uma diminuição na produção da IL-12p70. Entretanto, quando acrescentamos o atazanavir (1 μ M) à cultura, houve uma recuperação parcial da produção da citocina (p=0,05 teste t, medianas: 0,3425- 0,6150) (Figura 81).

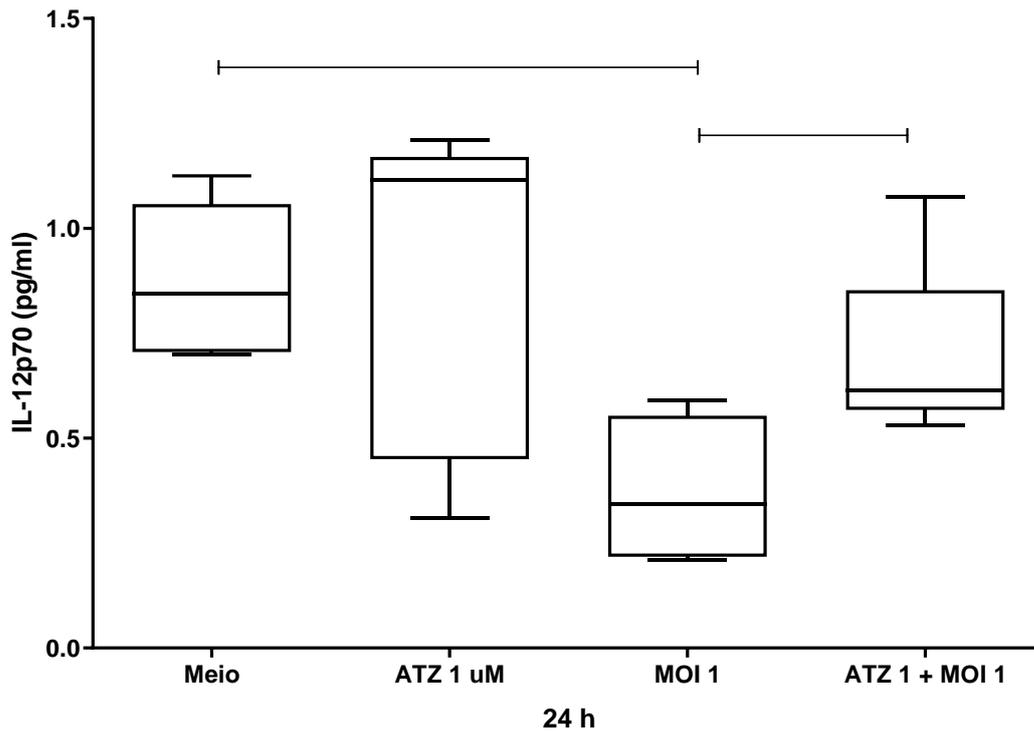


Figura 81: Influência do atazanavir (1 μ M) sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-12p70 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Observa-se uma tendência ao retorno da produção de IL-12 após administração no ATZ ($n=5$) ($p=0,05$, teste t). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Entretanto, observando os resultados quando as células foram tratadas com 3 μ M do medicamento, não houve diferença significativa entre os grupos com e sem o tratamento com a droga (Figura 82).

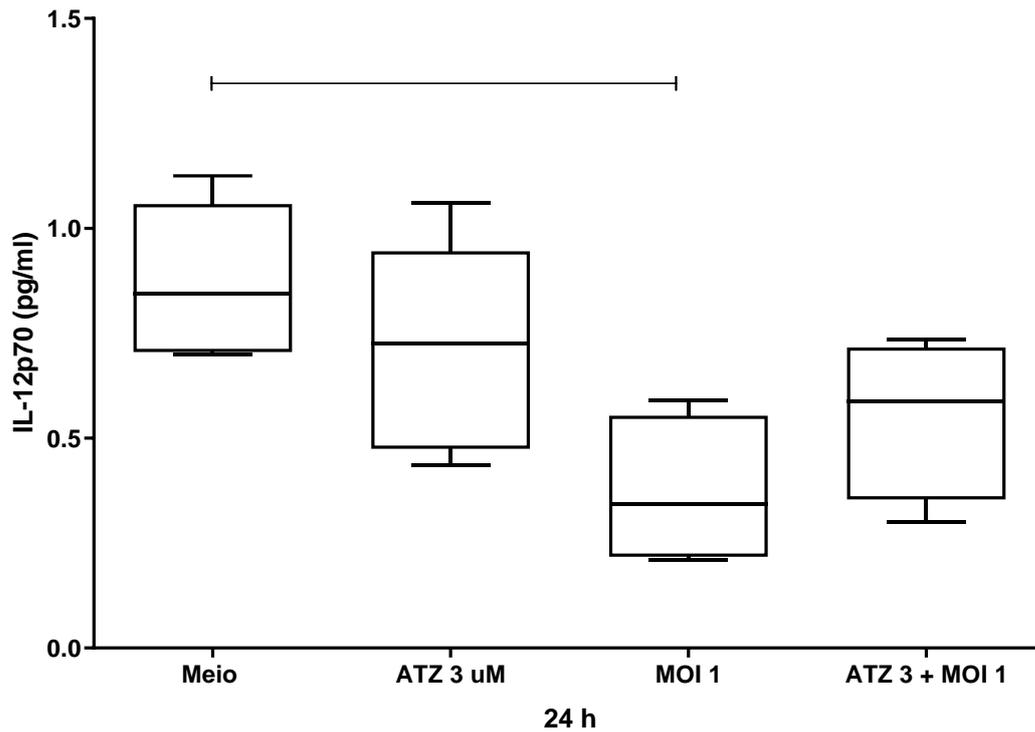


Figura 82: Influência do atazanavir (3 μ M) sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-12p70 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) ($p=0,2164$, teste t). Não houve diferença estatística entre o grupo MOI 1 e ATZ 3 + MOI 1. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

No intuito de verificar se a inibição da produção de espécies reativas do oxigênio influenciaria a produção da IL-12p70, os neuroblastos foram incubadas por 3 horas com o inibidor de EROs APDC, e então procedeu-se a incubação de

24 horas. Na presença do APDC-não foi observada diferença estatística entre os grupos (Figura 83).

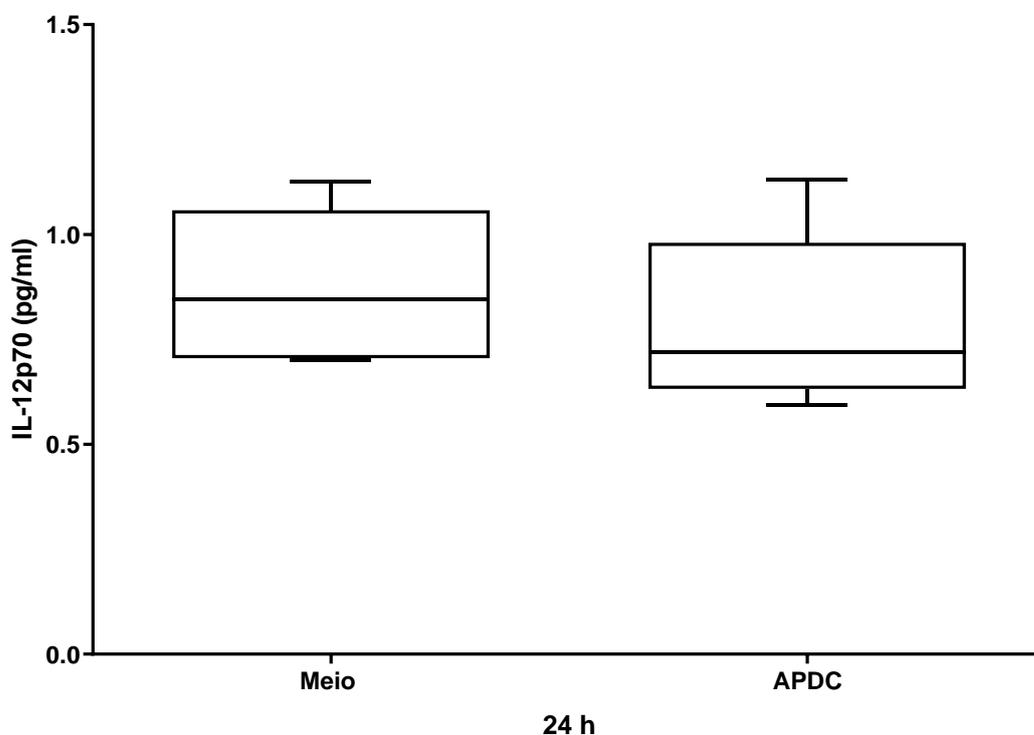


Figura 83: Influência do APDC sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-12 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) (p=0,5134, teste t). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Incubamos os neuroblastos com o inibidor da produção do EROs com o objetivo de verificar se na presença do vírus Zika, a inibição das espécies reativas de oxigênio alteraria a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos. Verificamos que após a incubação com o APDC, utilizando o vírus em ambas

concentrações (0,1 e 1 MOI) não foi observado alterações nos níveis da IL-12 p70 (Figura 84).

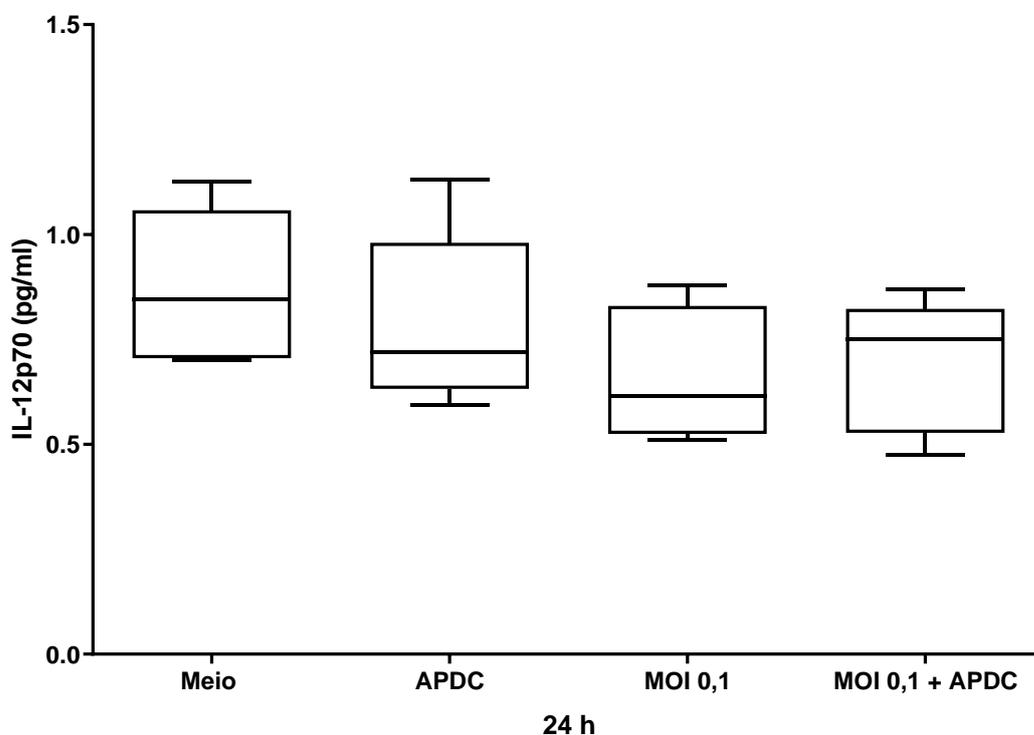


Figura 84: Influência do APDC sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h incubados com 0,1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-12p70 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) ($p=0,2684$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Não houve diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando a inibição da produção de EROs foi feita utilizando 1 MOI do vírus Zika verificamos que houve inibição total da produção da IL-12p70 pela inibição concomitante da produção das espécies reativas de oxigênio ($p=0,0048$,

Kruskal-Wallis seguido pelo método de comparação de Dunn; meio e APDC > Zika + APDC) (Figura 85).

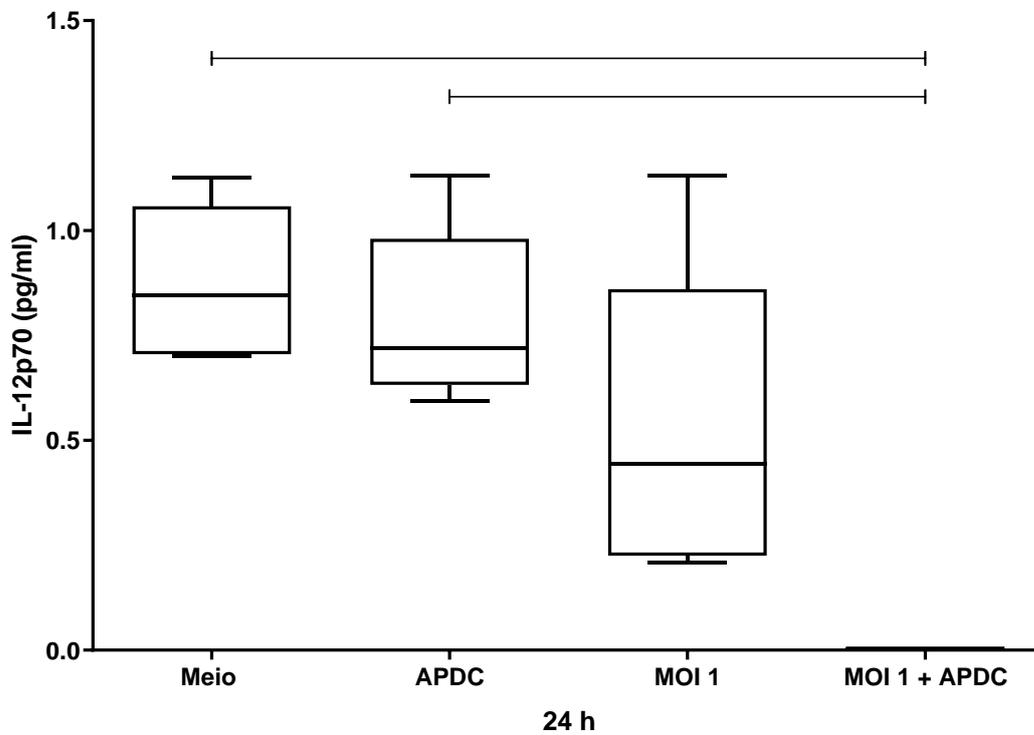


Figura 85: Influência da inibição da produção de EROs com o APDC sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-12 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($p = 0,0048$ pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo método de Dunn; meio e APDC > Zika + APDC). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Com o objetivo de verificar se a inibição de EROs modificava o efeito do atazanavir (1 e 3 μM) a produção de IL-12p70, os neuroblastos foram incubados com o APDC e tratados com o medicamento. Não observamos diferença na produção da IL-12 p70 entre os grupos (Figura 86).

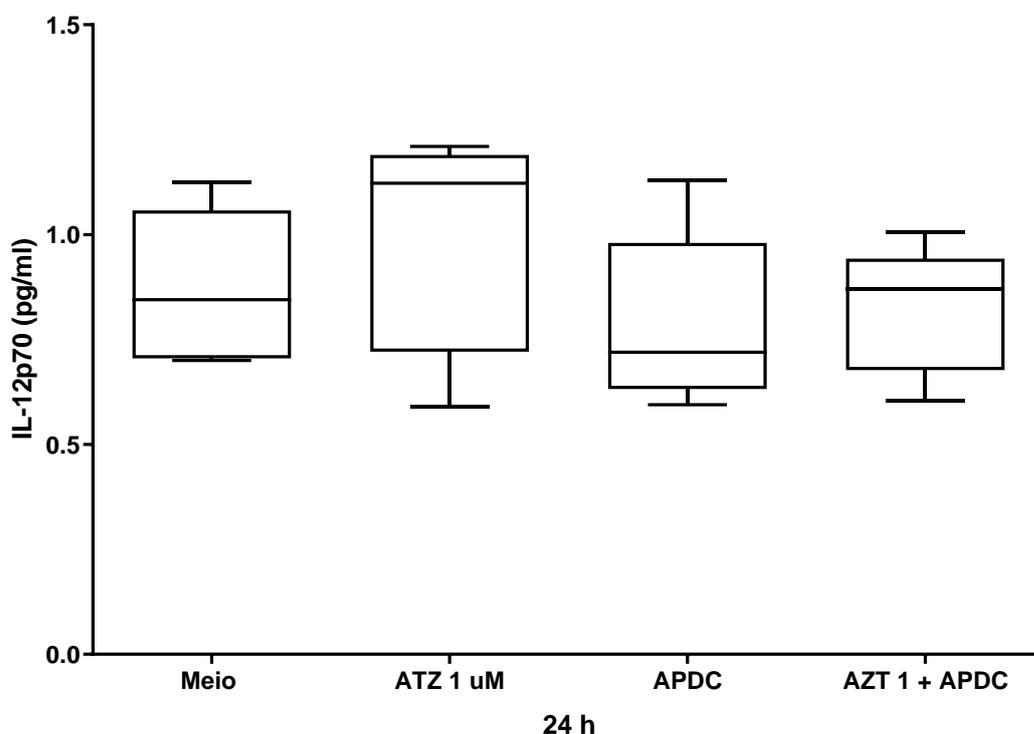


Figura 86: Influência da inibição das espécies reativas de oxigênio pela incubação com o APDC sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h tratados com o atazanavir (1 μM). A determinação da IL-12p70 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Interessantemente na presença do atazanavir 3 μM observamos um aumento da produção de IL12p70 quando associado o medicamento ao inibidor de EROs ($p < 0,05$ teste t, medianas: 0,725 e 1,05) (Figura 87).

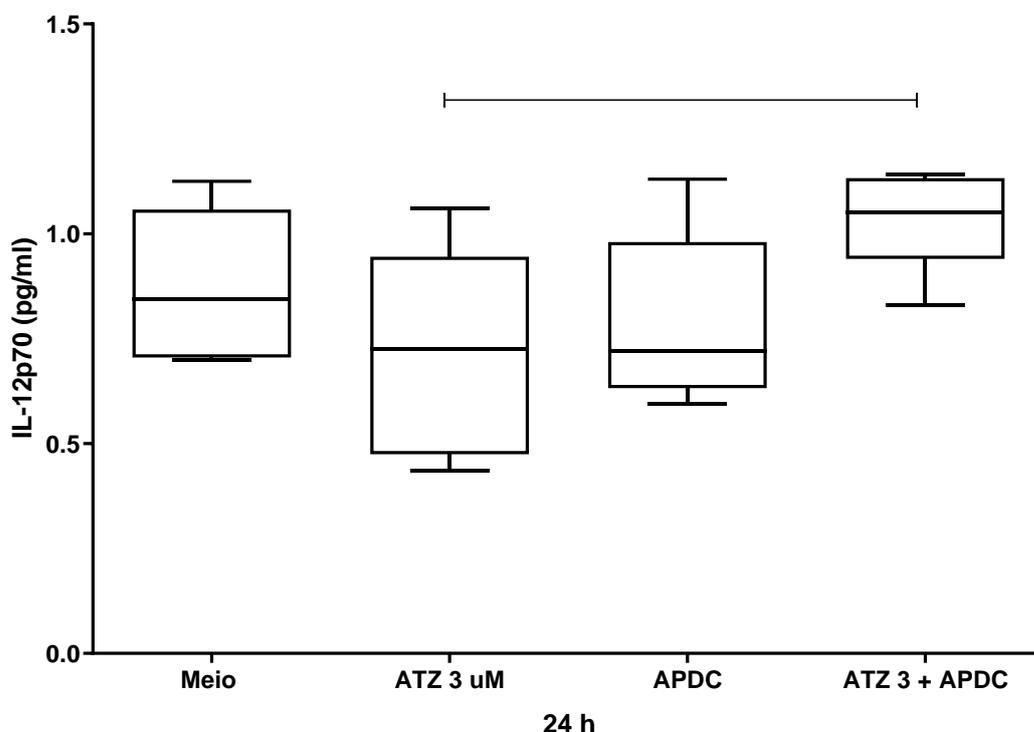


Figura 87: Influência da inibição da produção de radicais de oxigênio pelo APDC sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h tratados com 3 μM de atazanavir. A determinação da IL-12p70 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve maior produção da citocina na presença do ATZ 3 + APDC quando comparado com o grupo ATZ 3 ($n=5$) ($p=0,03$, teste t). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

No intuito de verificar se a inibição da produção de radicais de nitrogênio influenciaria a produção da IL-12p70, as células foram incubadas por 3 horas com o inibidor de ERNs diapocinina, e então incubadas por 24 horas. Não foi observada diferença estatística na comparação entre as células com o meio e com a diapocinina (Figura 88).

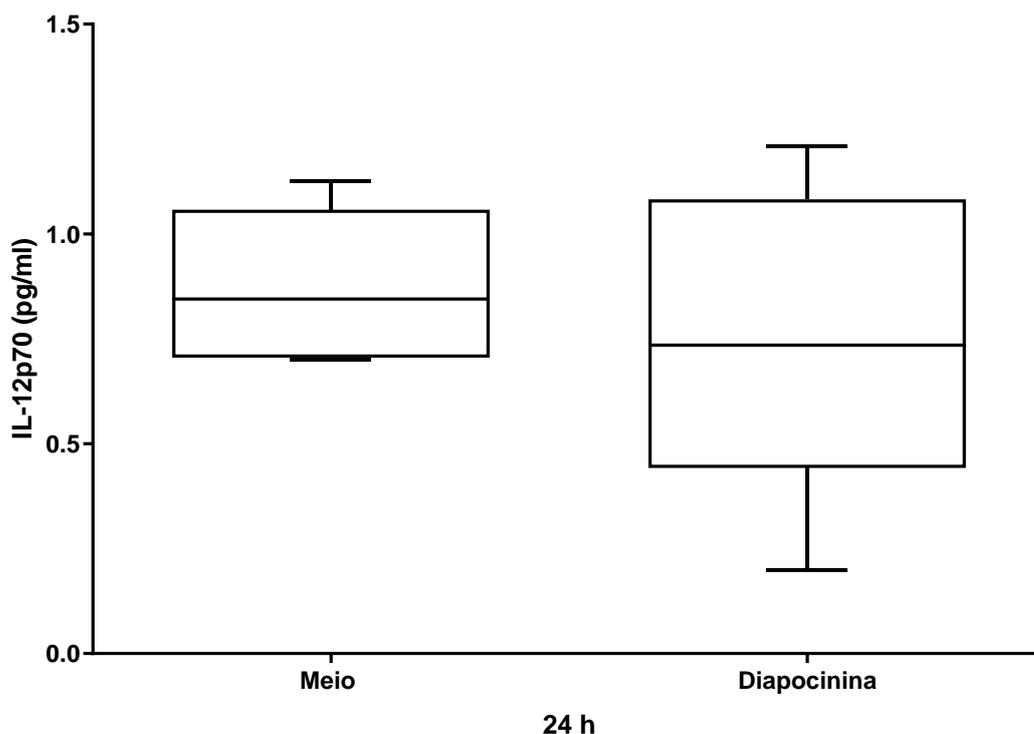


Figura 88: Influência da inibição da produção de radicais de nitrogênio pela diapocinina sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-12p70 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) ($p=0,5477$, teste t). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Entretanto, quando os neuroblastos foram incubados com o 0,1 MOI do vírus Zika, a inibição da produção dos radicais de nitrogênio pela diapocinina ocasionou uma inibição da produção da IL-12p70 pelas neuroblastos ($p=0,015$ ANOVA seguido do teste de Tukey, medianas: 0,845 e 0,51), também foi observada diferença entre o grupo Diapocinina e o MOI 0,1 + Diapocinina ($p=0,015$ ANOVA seguido do teste de Tukey, medianas: 0,72 e 0,51) (Figura 89).

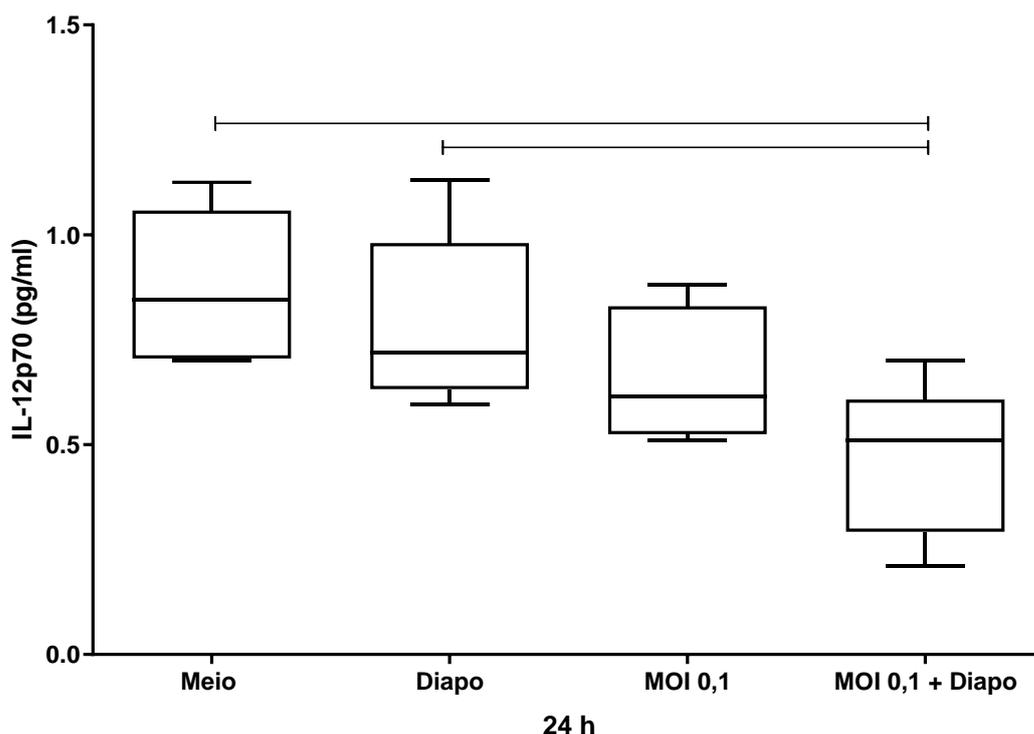


Figura 89: Influência da inibição da produção de espécies reativas de nitrogênio pela diapocinina sobre a produção de IL-12p70 pelos neuroblastos em cultura por 24h com 0,1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-12p70 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) Houve diferença entre o grupo Meio e o MOI 0,1 + Diapo ($p=0,015$ ANOVA seguido do teste de Tukey) e também entre o grupo Diapocinina e o MOI 0,1 + Diapo ($p=0,015$ ANOVA seguido do teste de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em síntese, houve menor produção de IL12p70 na presença do vírus MOI 1, o atazanavir 1 μ M aumentou essa concentração na presença do Zika MOI 1. A inibição de ERNs na presença do vírus MOI 0,1 reduziu a concentração da citocina.

- **IL-10**

Para verificar o efeito da infecção pelo vírus Zika na concentração de IL-10 pelos neuroblastos foi feita a determinação da citocina no sobrenadante das culturas após 24 horas de incubação com 0,1 MOI e 1 MOI do vírus Zika. Observamos que a infecção não foi capaz de alterar estatisticamente a concentração da citocina (Figura 90).

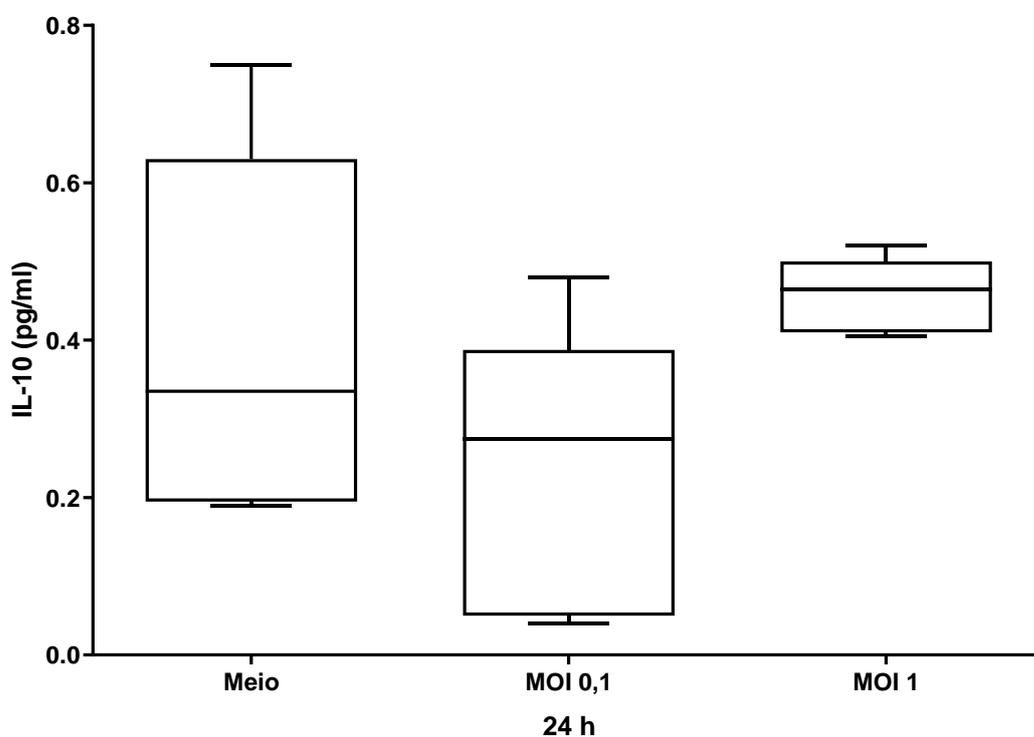


Figura 90: Influência do vírus Zika nas proporções de 0,1 e 1 MOI sobre a produção de IL-10 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-10 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) (p=0,1583, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Não houve diferença estatística. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Para verificar se o medicamento Atazanavir foi capaz de modificar a produção da IL-10, as células foram incubadas por 24 horas com ambas as concentrações do medicamento, 1 e 3 μ M. Não observamos diferença estatística (Figura 91).

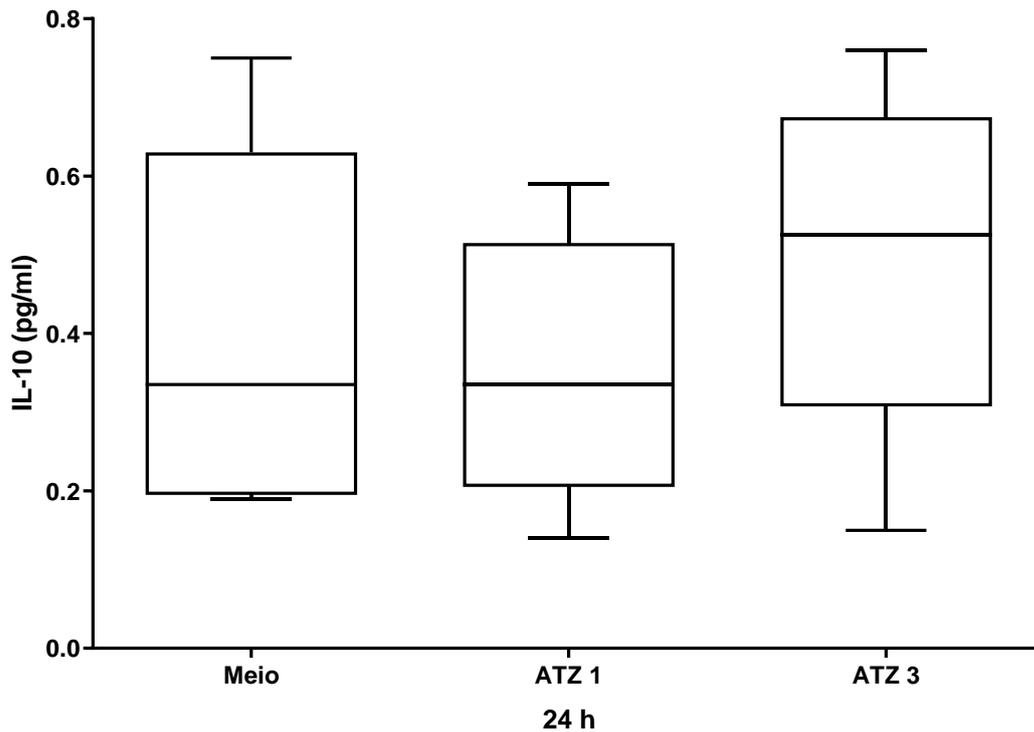


Figura 91: Influência do atazanavir nas concentrações de 1 e 3 μM sobre a produção de IL-10 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-10 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,5639$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

No intuito de verificar se o medicamento poderia alterar a concentração da citocina na presença do vírus Zika (MOI 0,1), as células foram tratadas com o atazanavir na concentração de 1 μM . Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 92).

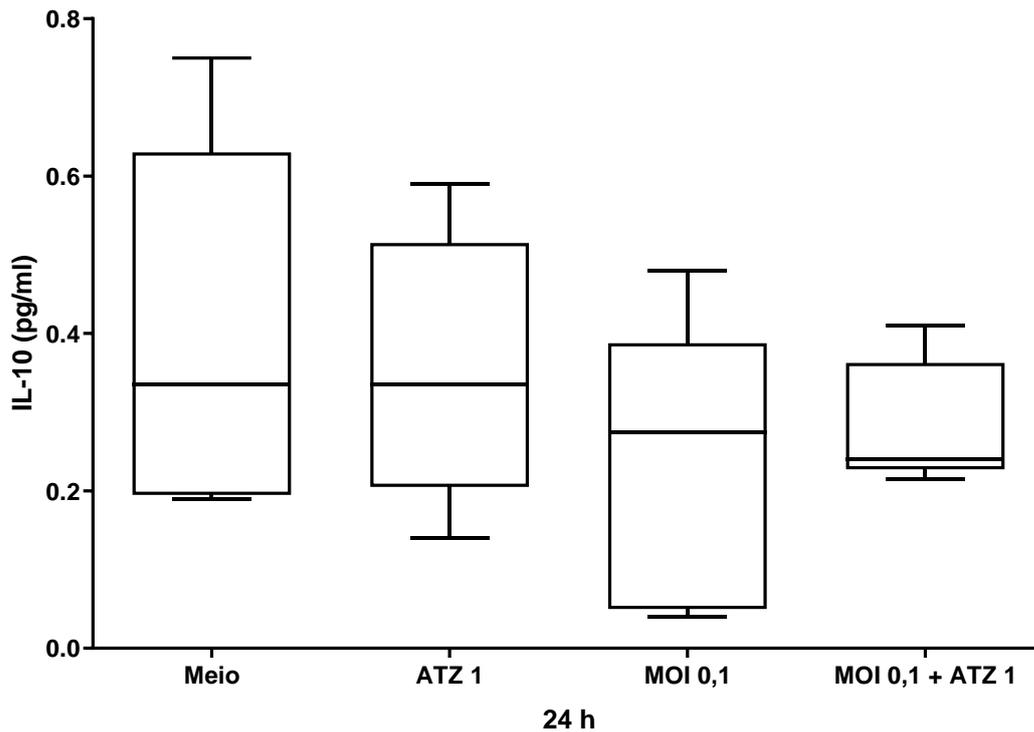


Figura 92: Influência do atazanavir ($1\mu\text{M}$) sobre a produção de IL-10 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-10 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,4709$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Entretanto, quando aumentada a concentração do medicamento para $3\mu\text{M}$, observamos um aumento na produção da IL-10 pelos neuroblastos tratados com o atazanavir (MOI 0,1 e MOI 0,1 + ATZ 3) ($p=0,0415$, teste t) (Figura 93).

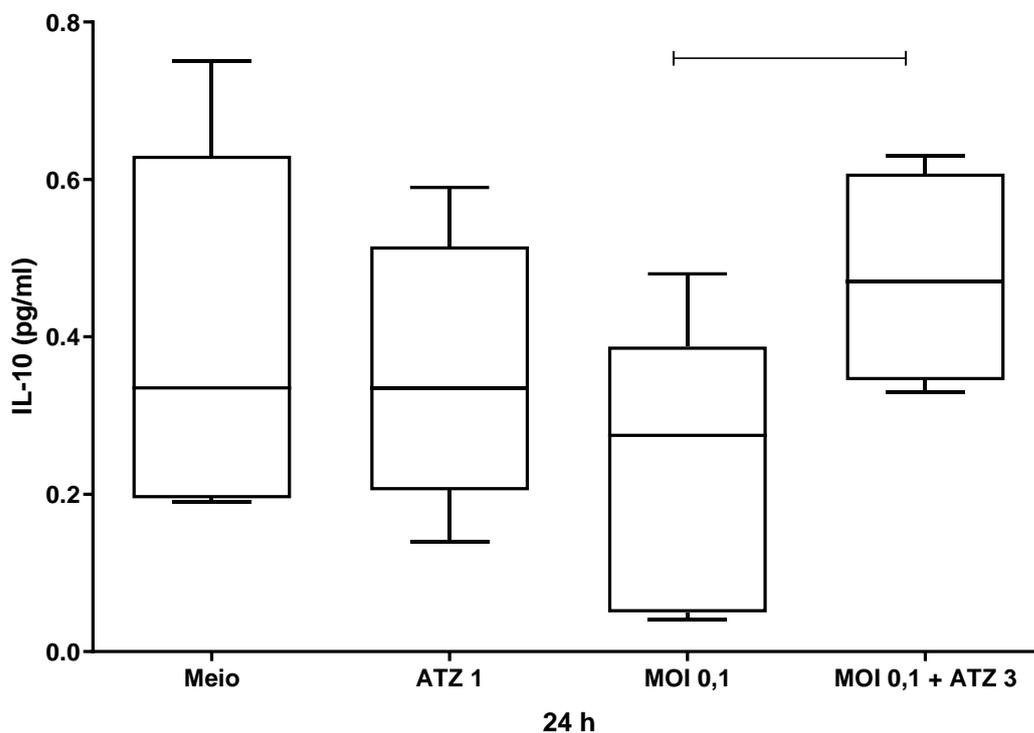


Figura 93: Influência do atazanavir ($3\mu\text{M}$) sobre a produção de IL-10 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 Moi do vírus Zika. A determinação da IL-10 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve diferença na comparação entre os grupos MOI 0,1 e MOI 0,1 + ATZ 3 ($n=5$) ($p=0,0415$, teste t). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Porém, quando aumentada a proporção de vírus para MOI 1, não observamos diferenças estatísticas em ambas as concentrações do medicamento (Figura 94 e 95).

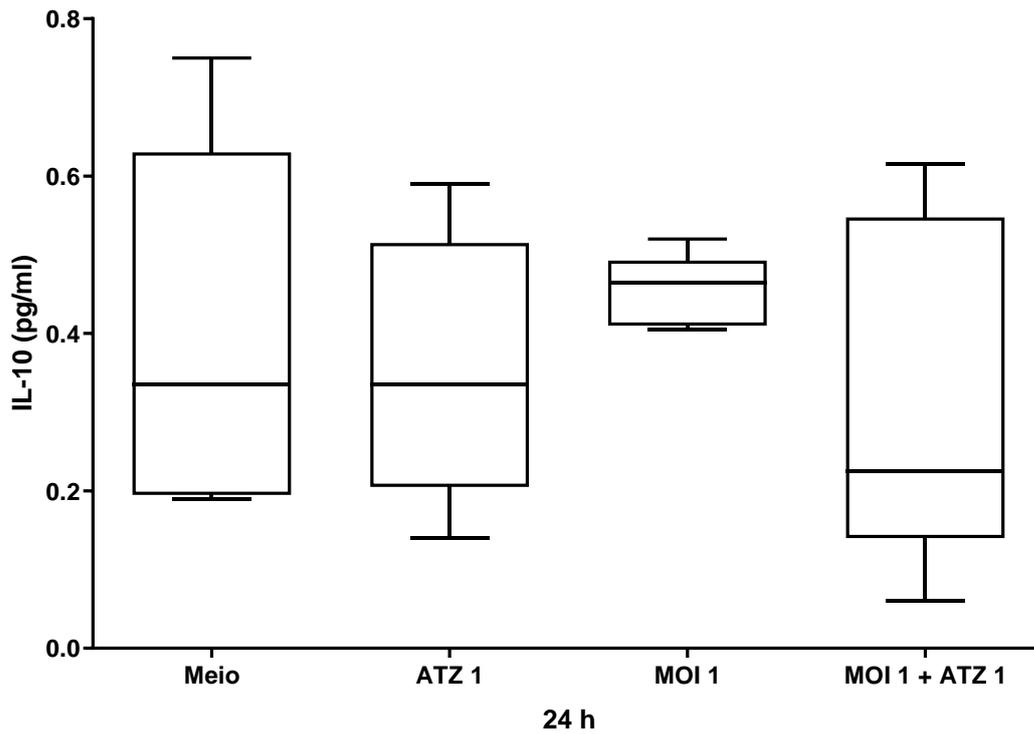


Figura 94: Influência do atazanavir ($1\mu\text{M}$) sobre a produção de IL-10 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-10 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,6963$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

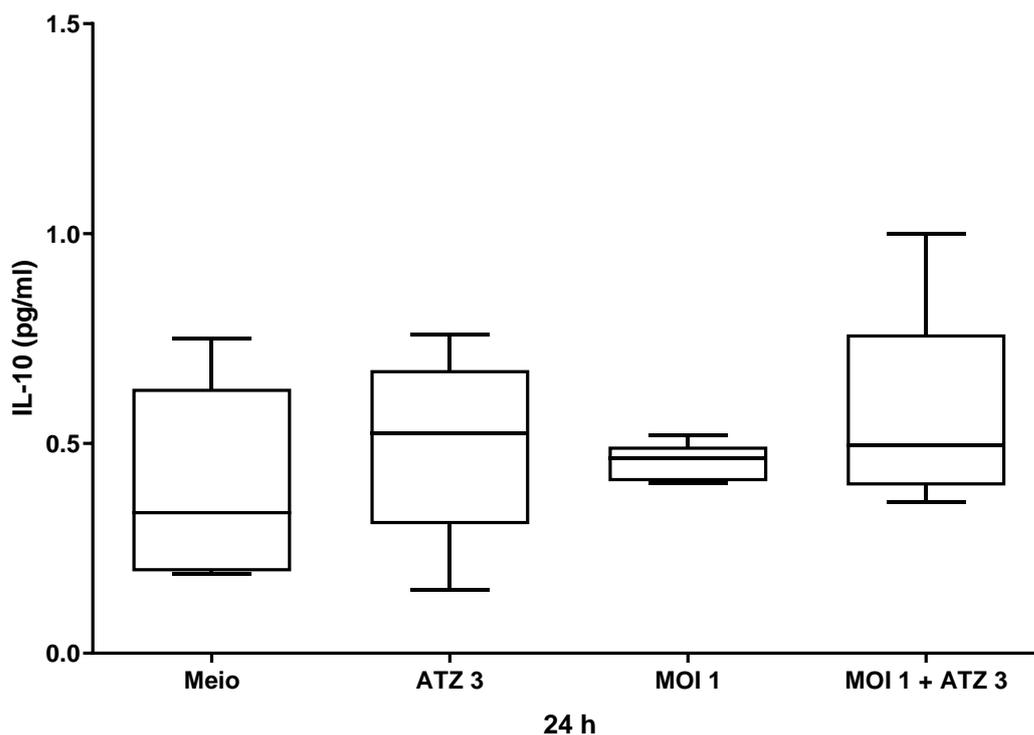


Figura 95: Influência do atazanavir ($3\mu\text{M}$) sobre a produção de IL-10 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-10 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,6400$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Resumidamente, observamos que o atazanavir $3\mu\text{M}$ aumentou a produção da citocina na presença do vírus na proporção 0,1.

- **IL-8**

Para analisar a influência da infecção pelo vírus Zika na produção da quimiocina IL-8 pelos neuroblastos, essas células foram incubadas na presença ou ausência do vírus Zika, e após adsorção por 1 hora do vírus, as células foram incubadas por mais 24 horas, e então a concentração da IL-8 foi determinada no sobrenadante das culturas. Foi feita a determinação por kit CBA citometria de fluxo. A presença do vírus ZIKA não modificou a produção da citocina nas duas proporções do vírus Zika (MOI 0,1 e 1) utilizadas (Figura 96).

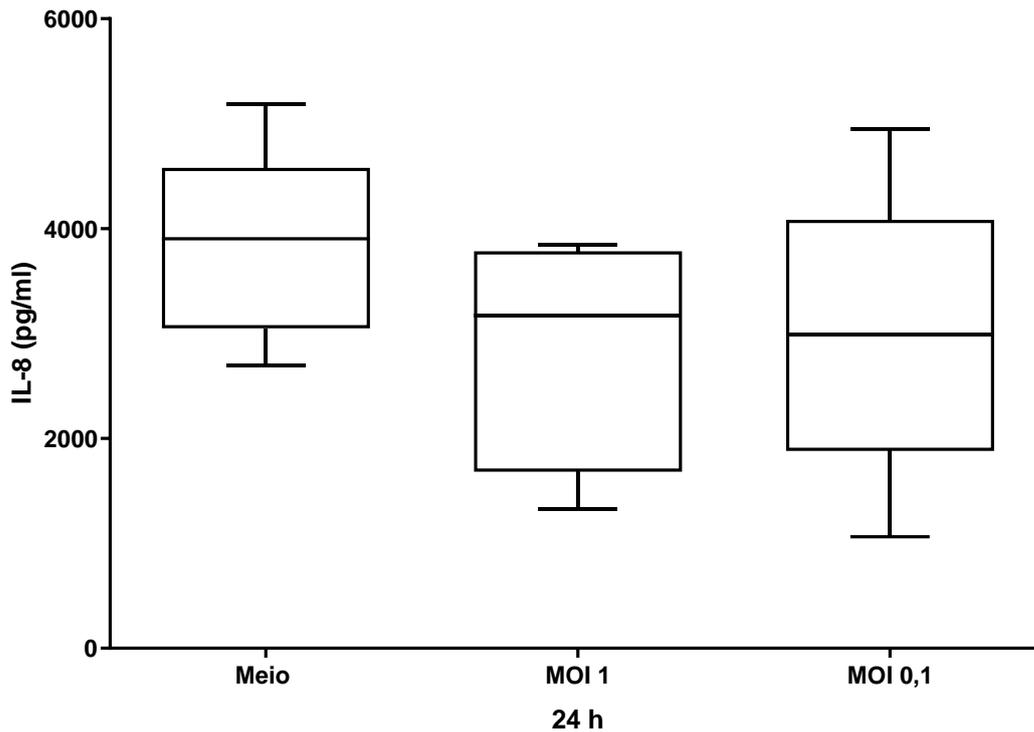


Figura 96: Influência do vírus Zika nas proporções de 0,1 e 1 MOI sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-8 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) (p=0,4090, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Para avaliar a influência do atazanavir na produção de IL-8 pelos neuroblastos, as células foram incubadas por 24 horas com o medicamento em ambas as concentrações (1 e 3 μ M), e após o período de incubação o sobrenadante foi separado para análise em citometria de fluxo. O atazanavir não modificou a produção da IL-8 pelos neuroblastos. Não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 97).

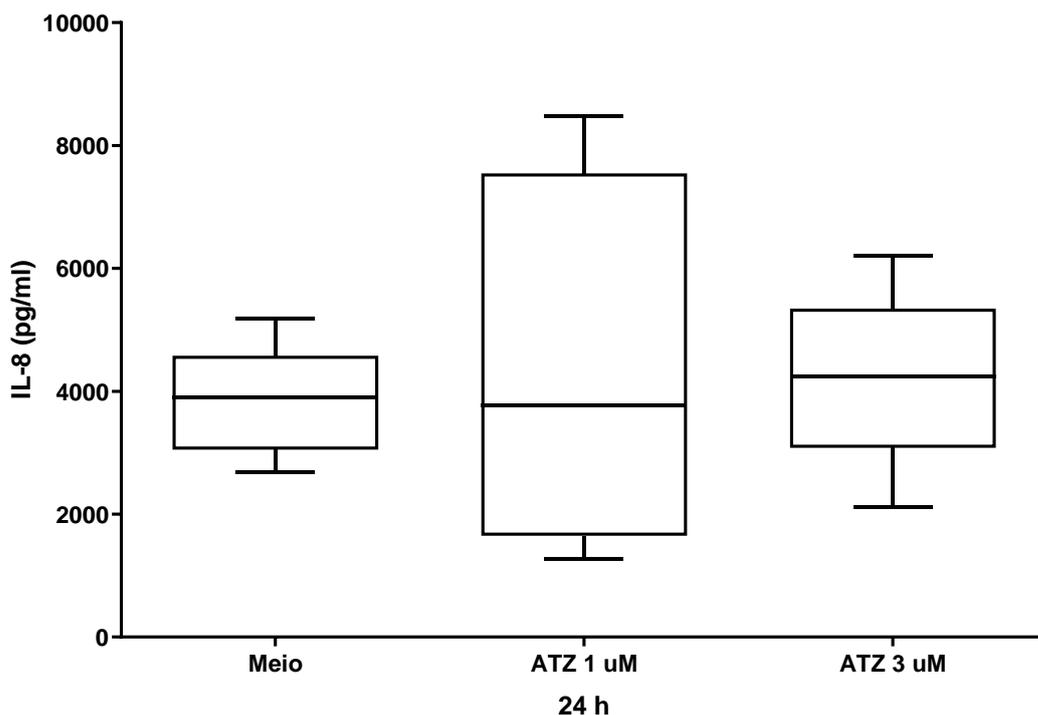


Figura 97: Influência do atazanavir nas concentrações de 1 e 3 μM sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-8 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,8205$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

No intuito de avaliar se o atazanavir influenciaria a produção de IL-8 após a infecção dos neuroblastos pelo vírus Zika, as células foram adsorvidas com o vírus por 1 hora, e então incubadas com o medicamento por 24 horas, após isso o sobrenadante foi coletado e a IL-8 foi determinada por kit CBA por citometria de fluxo. Não observamos diferença estatística na concentração do medicamento em 1 μM (Figura 98).

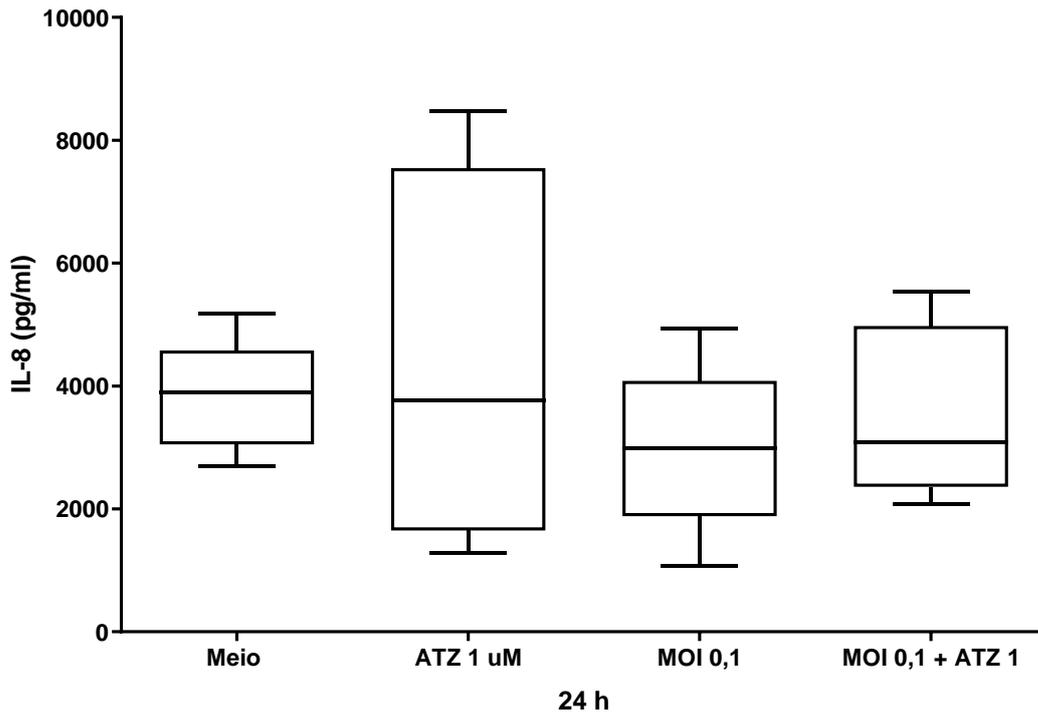


Figura 98: Influência do atazanavir (1 μM) na produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença do vírus Zika (MOI 0,1). A determinação da IL-8 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,7983$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Entretanto, observamos um padrão diferente quando a concentração do atazanavir foi aumentada para 3 μM , o medicamento foi capaz de reduzir significativamente a produção de IL-8 pelos neuroblastos na presença do vírus Zika ($p=0,0060$, ANOVA seguido do teste de Tukey, medianas: 2995 e 1353) (Figura 99).

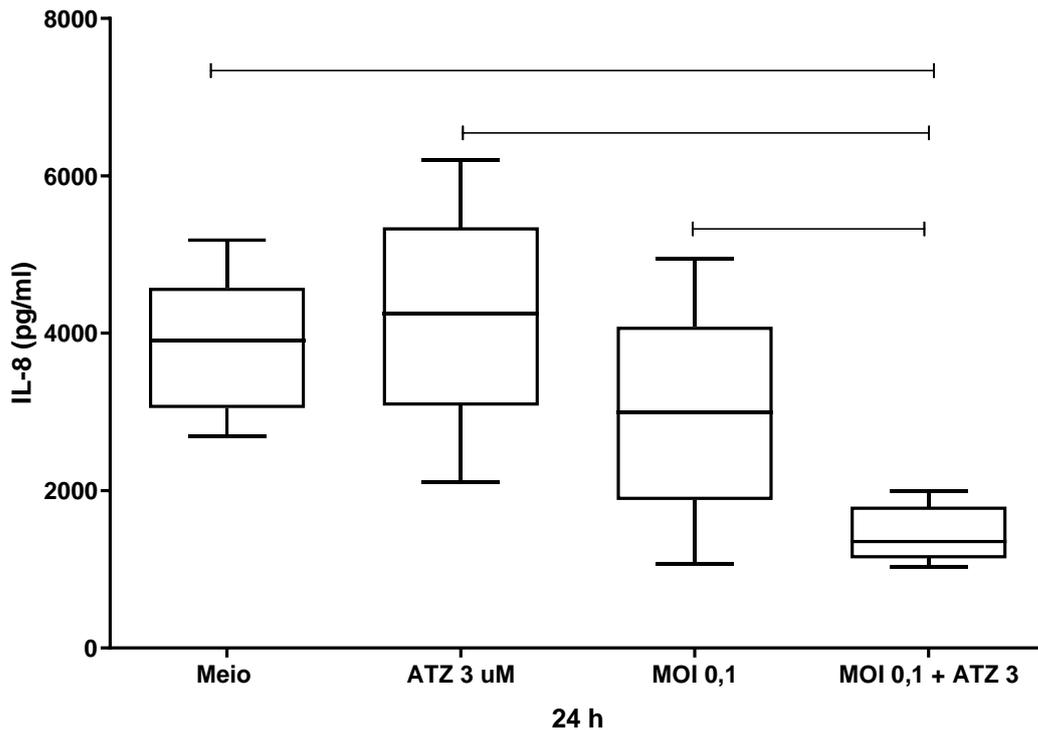


Figura 99: Influência do atazanavir ($3 \mu\text{M}$) sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença do vírus Zika (MOI 0,1). A determinação da IL-8 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve diminuição na produção de IL-8 no grupo MOI 0,1 + ATZ 3 quando comparado com todos os outros grupos ($n=5$) ($p=0,0060$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando aumentada a proporção do vírus Zika (MOI 1) e o atazanavir foi utilizando na concentração de $1 \mu\text{M}$, não observamos diferença estatística entre os grupos (Figura 100).

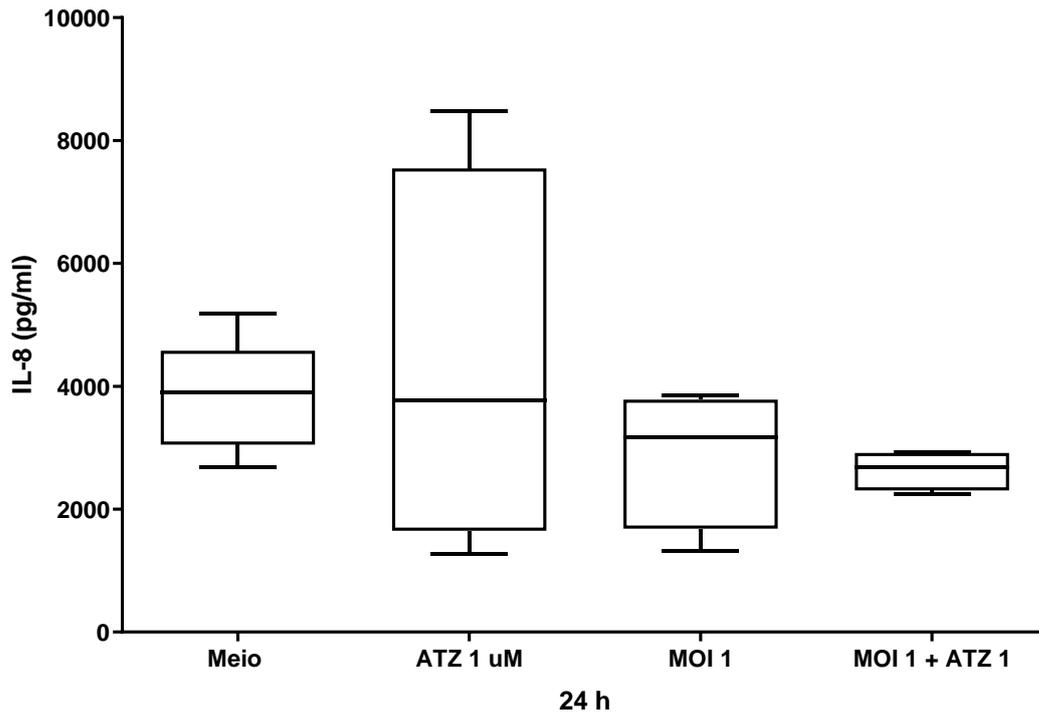


Figura 100: Influência do atazanavir (1 μM) sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença do vírus Zika (MOI 1). A determinação da IL-8 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA ($n=5$) ($p=0,4626$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

O mesmo padrão de resposta foi observado para 3 μM do atazanavir. Não houve diferença estatística na concentração de 3 μM do atazanavir quando associado com a proporção de MOI 1 do vírus Zika (Figura 101).

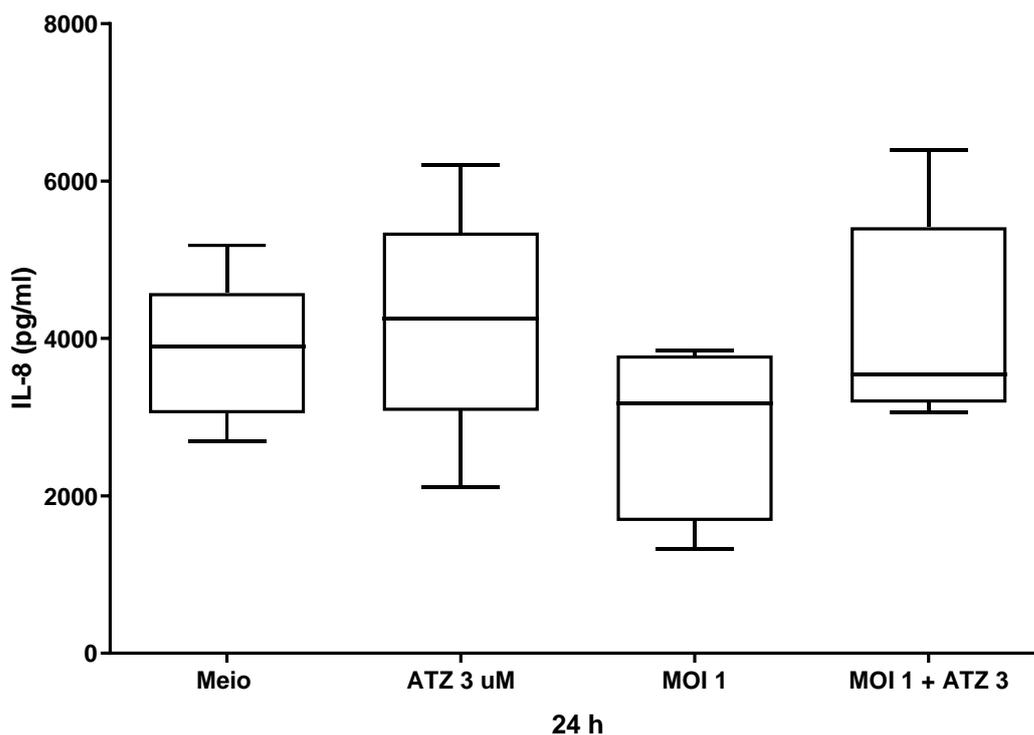


Figura 101: Influência do atazanavir (3 μM) sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença do vírus Zika (MOI 1). A determinação da IL-8 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,3698$, Kruskal-Wallis seguido do método de comparação de Dunn). Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Para avaliar se a produção de EROs influenciou a produção de IL-8 pelos neuroblastos, o inibidor da produção de espécies reativas de oxigênio APDC foi acrescentado às culturas por 3 horas, após isso as células foram então incubadas por 24 horas e o sobrenadante foi coletado e a concentração da IL-8 foi determinada por citometria de fluxo. Não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 102).

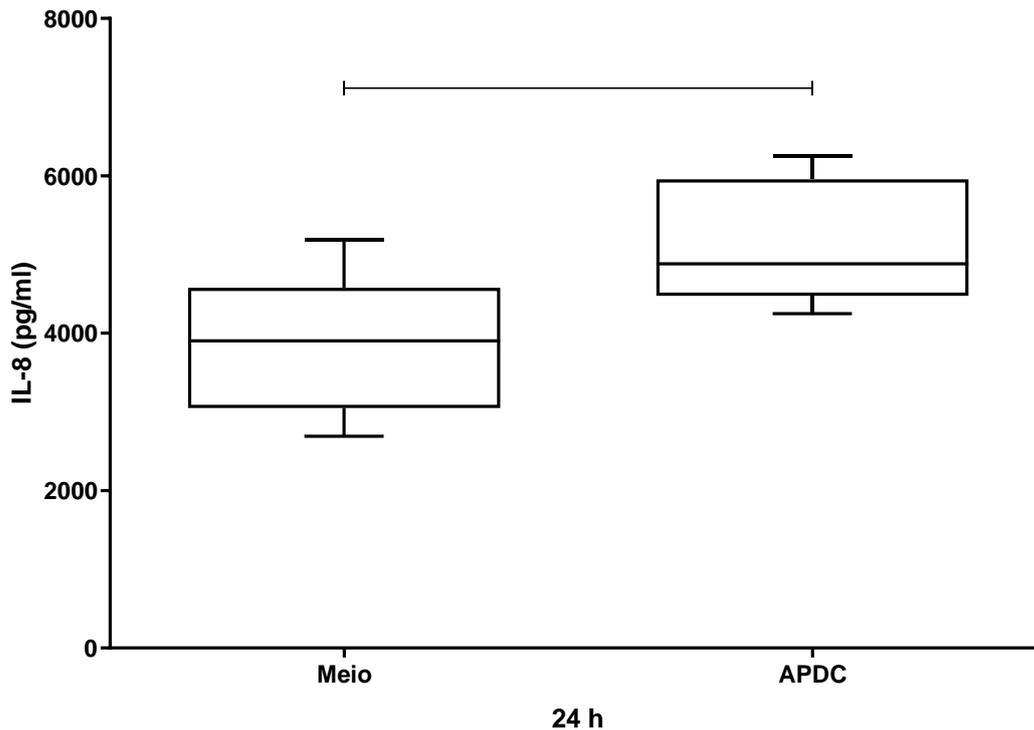


Figura 102: Influência do APDC sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-8 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. (n=5) ($p < 0,05$, teste t). Houve aumento da produção de IL-8 na presença do APDC. Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Ao associar o inibidor APDC na presença do vírus Zika na proporção MOI 0,1, observamos diferença na produção de IL-8 entre o grupo APDC e o MOI 0,1 ($p = 0,0361$, ANOVA seguido do método de múltiplas comparações de Tukey, medianas: 4881 e 2995) (Figura 103).

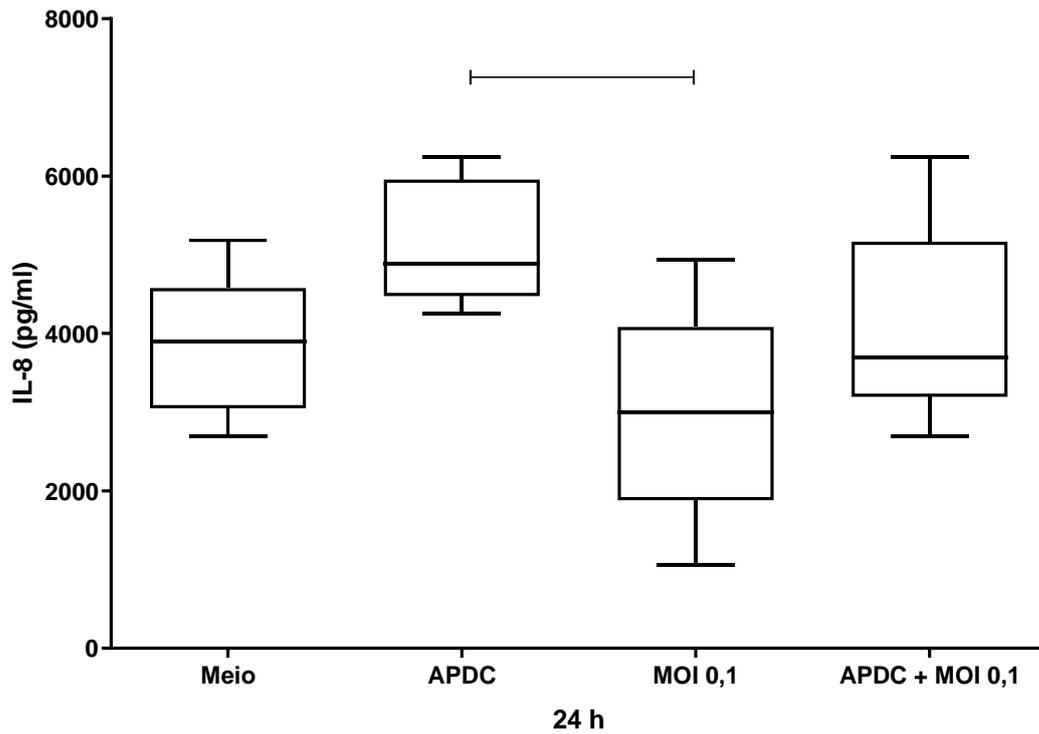


Figura 103: Influência do APDC sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-8 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve menor produção de IL-8 no grupo MOI 0,1 quando comparado com o APDC ($n=5$) ($p=0,0361$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Para analisar a influência do ERNs na produção de IL-8, ela foi inibida através da diapocinina em uma incubação de 3 horas, após isso as células foram incubadas por 24 horas, o sobrenadante foi retirado e analisado por citometria de fluxo. Observamos menor expressão de IL-8 após ação da diapocinina ($p < 0,05$, Teste t) (Figura 104).

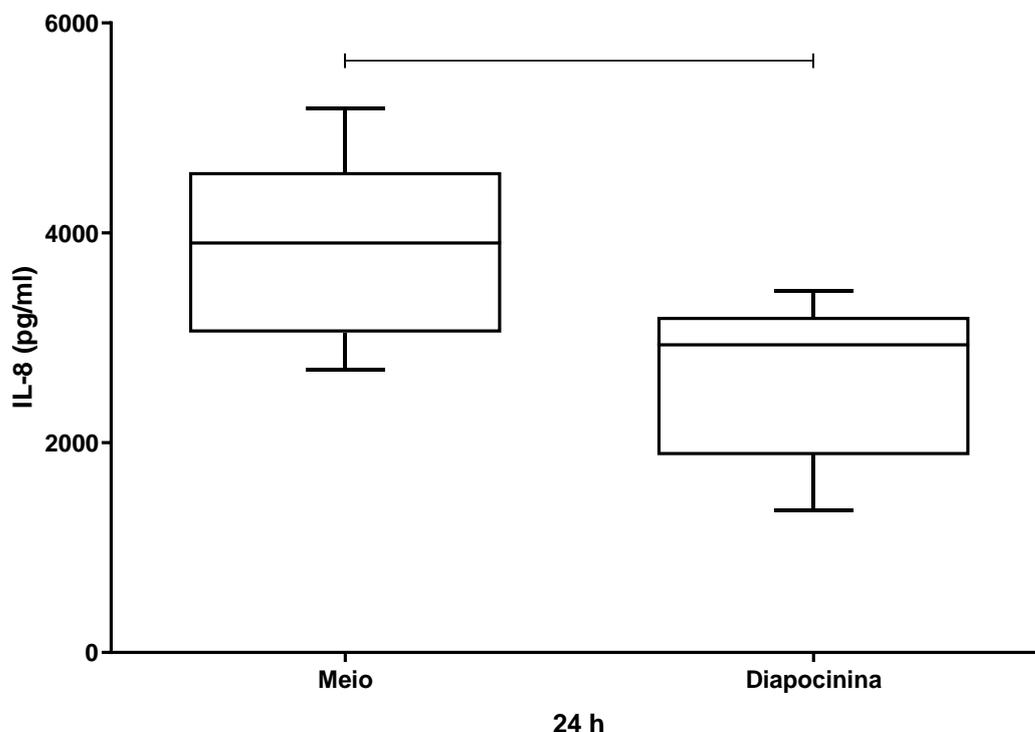


Figura 104: Influência da diapocinina sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h. A determinação da IL-8 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. ($n=5$) ($p=0,55$, teste t). Menor expressão de IL-8 no grupo com diapocinina ($p < 0,05$, Teste t). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Quando a diapocinina foi associada a infecção pelo vírus Zika na proporção MOI 0,1, observamos uma menor produção da IL-8 pelos neuroblastos ($p=0,0043$, ANOVA seguido do teste de Tukey, medianas: 3903 (meio), 2995 (MOI 0,1) e 924,5 (MOI 0,1 + Diapo)) (Figura 105).

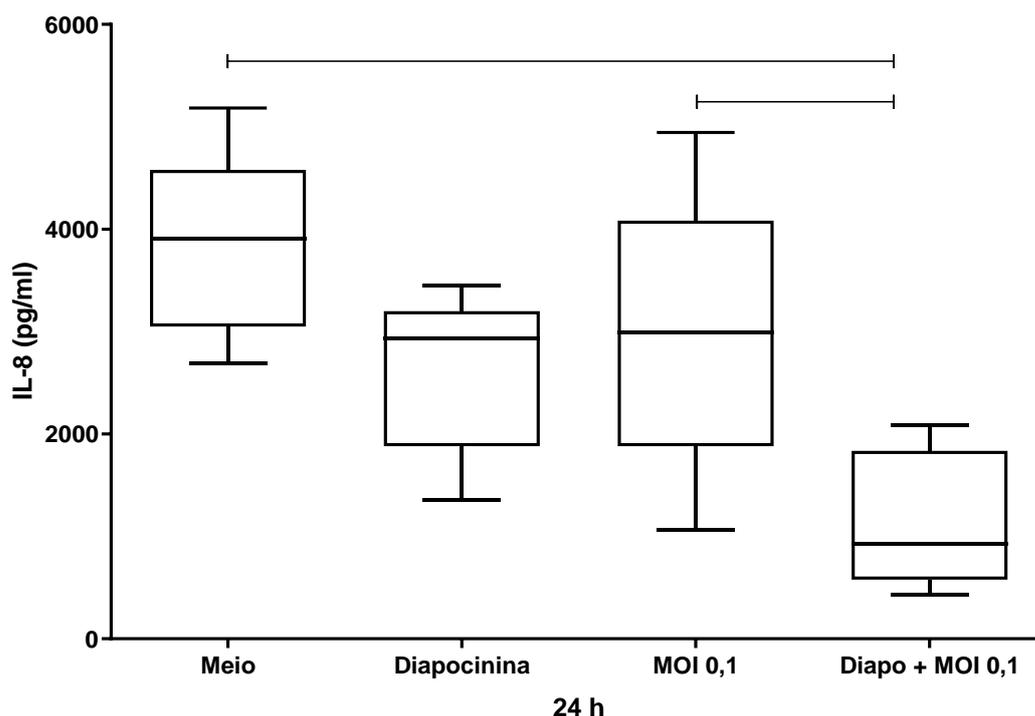


Figura 105: Influência diapocinina sobre a produção de IL-8 pelos neuroblastos em cultura por 24h na presença de 0,1 MOI do vírus Zika. A determinação da IL-8 foi feita por citometria de fluxo por kit CBA. Houve menor produção da citocina no grupo Diapo + MOI 0,1 quando comparado com os grupos Meio e MOI 0,1, ($n=5$) ($p=0,0043$, ANOVA seguido do teste de Tukey). Os dados estão representados como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

Em síntese, houve menor produção de IL-8 na presença do atazanavir 3 μM e do vírus 0,1. O APDC aumentou a produção da citocina. A diapocinina reduziu essa produção, e reduziu ainda mais em associação com o vírus na proporção 0,1.

DISCUSSÃO

Nossos dados mostraram que o vírus infecta o neuroblasto e quando em contato com o vírus Zika houve aumento da morte dos neuroblastos em cultura. Esses dados ajudam a explicar o desenvolvimento da microcefalia descrita no feto de gestantes que adquiriram a infecção durante o surto do Zika no Brasil (Brasil, 2018), desde que o vírus Zika mata o neuroblasto. Minor e cols (2017) já tinham mostrado que o vírus Zika tem tropismo pelos neurônios, entretanto, sua ação sobre os neuroblasto não estava ainda completamente entendida. Várias hipóteses tinham sido aventadas, como se o dano seria diretamente nas estruturas que participam da formação do cérebro e sua arquitetura, como cartilagens, osteoclastos, astrócitos, células da glia, ou somente nos neurônios maduros. Nossos dados evidenciaram a possibilidade de o dano ser também nos neuroblastos precursores dos neurônios, reduzindo assim a massa encefálica e levando em consequência à microcefalia. De fato, nossos dados estão de acordo com as observações de Driggers e cols (2016) que mostraram por exame microscópico post-mortem obtido de feto que apresentou uma grande diminuição do perímetro cefálico durante a infecção pelo vírus Zika uma abundante quantidade de neurônios apoptóticos na área do córtex parietal.

Há vários possíveis mecanismos de morte do neuroblasto pelo vírus Zika. Nossos dados mostraram que quando utilizamos a marcação por anexina, que houve apoptose nos neuroblastos tanto no grupo controle quanto no grupo com o vírus Zika. A apoptose presente no grupo com o vírus também foi observada por Souza e cols (2016), indicando que a apoptose seria um possível mecanismo utilizado pelo vírus para induzir a morte da célula. Estudando a SK-N-BE (2), Lee e cols. (2019) também observaram a presença de apoptose.

A expressão de caspase-3 é uma avaliação indireta da morte dos neuroblastos por apoptose, pois o aumento da expressão de caspase-3 pode estimular os mecanismos de morte celular por apoptose na célula. Nossos dados mostraram uma maior porcentagem de células expressando caspase-3 quando os neuroblastos foram incubados com 1 MOI do vírus Zika, sugerindo que a morte dos neuroblastos pode ocorrer também por esse mecanismo. Ausência de expressão de caspase-3 é comumente observada em neuroblastomas, entretanto, nossos dados mostraram que, embora numa porcentagem pequena, os neuroblastos SK-N-BE (2) podem expressar essa proteína (Lolascon et al. 2003). Entretanto, mesmo expressando a caspase-3, não observamos uma alta

atividade apoptótica nas células. Esses dados estão de acordo com as observações de Adida e cols. (1998), que sugeriram que provavelmente este tipo celular expressa o gene survivina, que mantém as células em um estado anti-apoptótico. Na presença de 1 MOI do vírus Zika, houve aumento discreto da expressão de caspase-3. Souza e cols (2016) observaram aumento na caspase-3 utilizando 0,1 MOI do vírus Zika, sugerindo que a expressão da proteína possa ser dependente da carga viral.

Quando analisamos a morte celular por necrose pela marcação das células com o iodeto de propídio, observamos que houve uma quantidade muito maior dos neuroblastos em necrose quando incubados com maior quantidade do vírus Zika (1 MOI), do que os que foram incubadas com uma proporção muito menor de 0,1 MOI e do que os neuroblastos não infectados. Essas observações sugerem que no MOI 1, no qual havia uma maior quantidade de vírions no meio, possivelmente o estímulo foi muito maior para a célula, estimulando vias intracelulares que determinaram a morte dos neuroblastos por necrose, que é um fenômeno muito mais grave pela eliminação do conteúdo celular no microambiente e estímulo muito maior para a resposta inflamatória local, resultando em dano muito maior para o indivíduo. Os estudos com o iodeto de propídio confirmam as observações de necrose dos neuroblastos que observamos ao microscópio eletrônico. Nossos dados estão de acordo com o que foi observado por Daniels e cols. (2019), que mostraram que os neurônios podem utilizar as vias da necrose como defesa perante uma infecção viral, e que o vírus irá induzir a ativação do gene imunorresponsivo 1 e metabólitos de itaconato, consequentemente inibindo a formação da succinato desidrogenase e suprimindo a replicação viral.

Nossos dados sugerem que a morte dos neuroblastos pode ocorrer tanto por apoptose como por necrose e que aparentemente a morte por necrose foi relacionada com o aumento da carga viral. Entretanto, não pode ser excluído que a morte dos neuroblastos tenha ocorrido por necroptose, que é uma necrose natural da célula ocorrendo pela via da serina/treonina proteína quinase-3 (RIPK3), que é ativada e forma oligômeros que romperão a membrana celular (Linkermann & Green, 2014; Rashidi, Wicks & Vince, 2020)

Nossos dados mostraram que o atazanavir na concentração de 1 μ M diminuiu a morte neuronal quando as células foram expostas ao vírus Zika. Esse

fato é de crucial importância, pois se caso esse mesmo efeito se repetir em mulheres gestantes, a utilização dessa droga, que já é aprovada para utilização em gestantes, poderia diminuir o risco de desenvolvimento da microcefalia no feto.

Não está esclarecido o mecanismo pelo qual o atazanavir diminuiu a morte neuronal. Entretanto, possíveis mecanismos podem ser sugeridos. Alves et al (2015) mostraram que o atazanavir pode influenciar a via do NFκB, que pode modular a resposta inflamatória e a resposta das células ao vírus Zika, como também as vias que culminam na apoptose. Foi observado também por Chattopadhyay e cols. (2008) que o atazanavir melhorou a viabilidade celular na concentração 1 μM. Esses autores observaram pelo teste do MTT, que o atazanavir manteve a viabilidade de células endoteliais de microvasos cerebrais humanos e que conforme a dose do medicamento foi aumentando a viabilidade foi reduzindo.

Entretanto, a redução da expressão de anexina na presença de 0,1 MOI do vírus Zika são contrários aos observados por Vlahakis e cols. (2007), os autores observaram que diversos medicamentos que são inibidores de protease do VIH possuem atividades pró-apoptóticas, sendo o atazanavir um deles.

É possível que os diferentes mecanismos que observamos de morte do neuroblasto, por necrose ou apoptose, sendo a necrose relacionado com o aumento da carga viral, tenha influenciado o efeito do atazanavir nos neuroblastos. É possível que o atazanavir não tenha sido capaz de prevenir a morte por necrose quando em presença de excesso de partículas virais e na presença de concentrações maiores da droga, que se mostraram tóxicas para o neuroblasto.

O aumento da necrose nos neuroblastos quando expostos ao vírus Zika na proporção 0,1 MOI e tratados com o atazanavir (3 μM) é um aspecto importante que tem que ser levado em consideração, pois nessa concentração a droga poderia agravar as lesões neuronais. Esses resultados são semelhantes aos observados por Han e cols (2015), que também mostraram redução da viabilidade causada pelo atazanavir nessa concentração da droga. Foi observado que o atazanavir em uma concentração 30 vezes maior do que a recomendada (30 μM) inibiu o canal de potássio cardíaco em tecido humano clonado. Em nosso estudo, a concentração (3 μM) já foi suficiente para

apresentar efeito tóxico para o neuroblasto. Entretanto, este dado pode sugerir que o atazanavir poderia ser testado como um tratamento adjuvante para o tratamento de neuroblastomas, com o objetivo de estimular a morte da célula neoplásica. Pyrko e cols. (2007) observaram que o atazanavir é capaz de induzir a morte de células de um glioma por estresse no retículo endoplasmático. É uma possibilidade que a morte do neuroblasto determinada pela maior concentração do atazanavir que foi por nós observada não tenha ocorrido por este mecanismo, desde que o atazanavir diminuiu a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio nos neuroblastos e nossos dados mostraram que esses radicais se mostraram essenciais para a sobrevivência do neuroblastos.

Observamos que o atazanavir reduziu significativamente a expressão de caspase-3, entretanto, não foi capaz de reduzir a expressão da proteína na presença do vírus Zika. Nzuzo e cols. (2017) mostraram que o atazanavir aumentou a expressão de caspase-3 em células do pâncreas, enquanto nossos dados mostraram uma redução dessa proteína no neuroblasto. Isto sugere que o efeito do atazanavir pode ser dependente do tipo de célula estudada.

Outro mecanismo que pode levar a morte celular é um processo inadequado de autofagia. A autofagia é um processo de reciclagem altamente conservado nas células eucarióticas. Tem um papel importante na manutenção e na sobrevivência das células pela degradação de proteínas, macromoléculas, e organelas citoplasmáticas (Parzych e Koinsky, 2014), preservando as células do acúmulo de toxinas, moléculas e organelas danificadas e permite o desenvolvimento e diferenciação dos tecidos (Costas e Rubio, 2017).

Para melhor compreensão do processo de autofagia na infecção pelo vírus Zika, os neuroblastos incubados com o vírus foram tratados com um indutor (PP242) e com um inibidor (pepstatina) da autofagia. Observamos que o indutor de autofagia melhorou a viabilidade dos neuroblastos quando foi administrado junto com 1 MOI do vírus Zika, enquanto que o inibidor da autofagia aumentou a morte dos neuroblastos. Esses dados mostram a importância da autofagia na sobrevivência dos neuroblastos infectados pelo vírus Zika. Estes dados sugerem que o processo da autofagia deve ter um papel importante na preservação da viabilidade dos neuroblastos quando em contato com o vírus Zika e reforça a hipótese de que o processo de autofagia possa ser um dos mecanismos de limpeza do vírus pelos neuroblastos (Ojha, et al. 2019).

De fato, tem sido sugerido que a inibição da autofagia é um dos mecanismos utilizados como escape pelo vírus Zika. O processo é utilizado naturalmente pelas células como defesa antiviral, entretanto, aparentemente o vírus Zika altera a sinalização da via Akt-mTOR fazendo com que a ativação da autofagia seja desviada para replicação e propagação viral (Gratton, et al. 2019). O aumento da autofagia também pode aumentar a produção de EROs, devido a desordens mitocondriais (Nakahira et al. 2011). Entretanto, nossos dados mostraram resultados opostos, pois, após a infecção dos neuroblastos com o vírus Zika, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram menores. Uma possível explicação para esse fato é que essa diminuição foi devida à morte dos neuroblastos, desde que o vírus Zika possui alto tropismo para células neurais, além de importante efeito citopático (Miner et al. 2017). A pepstatina atua como um supressor de proteases lipídicas, inibindo as catepsinas D e E, e consequentemente, inibindo a autofagia (Yang et al. 2013). Nossos dados mostraram que em ambas as proporções do vírus Zika na presença da pepstatina a viabilidade dos neuroblastos diminuiu. Esse fato pode ter ocorrido por dois fatores: 1- Outra via de autofagia foi ativada das três vias de ativação; macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas; 2- O vírus manteve sua replicação independente da autofagia e assim reduziu a viabilidade das células (Kaushik, Singh & Cuervo, 2010).

Foi observado em neuroblastos estimulados por trealose, que é um indutor da autofagia, que houve redução do acúmulo de proteínas neurotóxicas (Lee et al. 2018). Além disso, inibição da Akt-mTOR, um importante sinalizador da via da autofagia, é um dos mecanismos de sobrevivência e adaptação apresentado pelo vírus Zika (Gratton, et al 2019). Neuroblastos que foram estimulados para diferenciar em neurônios, pelo tratamento com ácido retinóico, mostraram aumento da atividade autofágica, e a diferenciação celular foi acompanhada da diminuição do mTOR (Zeng & Zhou, 2008), e concordam com o efeito benéfico observado em nossos estudos na presença do indutor de autofagia.

Outro aspecto muito importante abordado em nosso estudo foi a análise das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e oxigênio (EROs) nos neuroblastos SK-N-BE (2), a análise do efeito do vírus sobre a produção dessas espécies reativas e a análise se sua inibição afetaria diretamente a viabilidade da célula.

Um dos aspectos fundamentais da microcefalia é a morte neuronal e os radicais de oxigênio e nitrogênio poderiam ser tóxicos para os neuroblastos e contribuir para a morte neuronal e para o desenvolvimento da microcefalia no feto.

Nossos dados mostraram que o vírus Zika inibiu a produção de EROs pelos neuroblastos e o atazanavir reverteu parcialmente essa inibição. Entretanto, quando foi feita a inibição da produção de EROs pela diapocinina e o seu efeito sobre a viabilidade dos neuroblastos foi avaliado, observamos que houve apenas inibição parcial da toxicidade do vírus para os neuroblastos, e somente para uma baixa concentração do vírus (0,1 MOI). Esses dados sugerem que o vírus inibiu a produção dos radicais de oxigênio pelos neuroblastos e que essa inibição diminuiu a viabilidade dos neuroblastos, e o atazanavir aumentou parcialmente a viabilidade dos neuroblastos.

A produção de espécies reativas de oxigênio pelas células do sistema imunitário tem uma função microbicida e pode ser tóxica para os microrganismos e para o tecido local (Brieger et al. 2012). Entretanto, no tecido neuronal as espécies reativas de oxigênio podem ter um papel fisiológico regulando a função das células. Oswald e cols. (2018) mostraram que as EROs auxiliam o desenvolvimento e função neuronal, regulando a conectividade, a transmissão sináptica e a plasticidade neuronal.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são subprodutos de eventos celulares e moléculas sinalizadoras para regular processos fundamentais, como proliferação, diferenciação e morte celular. Fazem parte da defesa contra microrganismos, entretanto, quando ocorre superprodução, ultrapassando os mecanismos antioxidantes, causam morte celular. O atazanavir mostrou ser capaz de diminuir a toxicidade neuronal pelo vírus Zika. Ao verificar a viabilidade do neuroblasto na presença do inibidor de EROs, observamos que não houve modificação na viabilidade da célula. Entretanto, na presença do vírus e da diapocinina houve uma redução da toxicidade causada pelo Zika (79,76% para 90,47%). Nossos dados sugerem que diminuição de EROs tem papel importantes na toxicidade pelo vírus Zika, como evidenciado pela melhora na viabilidade pela inibição da produção de EROs. Entretanto, pela inibição da produção de EROs com a diapocinina na presença do vírus a recuperação da produção de EROs foi apenas parcial, sugerindo que fontes alternativas da produção de EROs possam estar ocorrendo no neuroblasto. É possível que a

menor produção de EROs ocorra como um mecanismo de escape do vírus aos mecanismos antivirais. E esse efeito pode ser parcialmente revertido pelo tratamento com atazanavir.

Os EROs têm funções críticas na diferenciação, proliferação e apoptose e agem como segundo mensageiro (Marengo et al, 2005). Tem sido observado que os neuroblastos podem produzir radicais de oxigênio tanto pela via do NADPH (Zhang e cols, 2011) quanto por produtos intermediários durante a síntese e catabolismo das catecolaminas (Marengo e cols, 2005). É possível que a proteção parcial pela inibição da produção de EROS tenha sido devida ao fato de que a diapocinina inibe a produção de EROs pela via da NADPH, e não pelas outras vias metabólicas do neuroblasto, podendo assim ter ocorrido produção desses radicais por outras vias celulares. Entretanto, a proteção parcial da citotoxicidade para os neuroblastos pelo vírus Zika pela inibição da produção de EROs sugere que os radicais de oxigênio podem também participar dos mecanismos de toxicidade do vírus para essa célula.

As espécies reativas de oxigênio são geradas durante o estresse oxidativo, sendo então possível que sua produção em excesso seria tóxica para os neuroblastos. Nas células do sistema imunitário, como o macrófago, s EROs fazem parte dos mecanismos microbicidas e de sinalização, sendo que a via principal de sua produção é por meio da NADPH oxidase (Forman & Torres, 2002). Nos neuroblastos, as espécies reativas de oxigênio têm um papel principal no desenvolvimento celular, na polarização, na regulação da conectividade e na transmissão sináptica (Suzukawa et al. 2000). Devido a sua importância para as funções fisiológicas do neuroblasto, são vários os seus mecanismos de produção (Harijih, et al 2014).

Interessantemente, Oswald e cols. (2018), mostraram que as EROs auxiliam o desenvolvimento e função neuronal, regulando inclusive a conectividade, transmissão sináptica e plasticidade neuronal. Sua importância para a sobrevivência dos neuroblastos explica nossas observações de que houve um nível maior de produção nos neuroblastos. O que chama a atenção no nosso estudo é que mesmo após a inibição do EROs pela diapocinina, a viabilidade celular não foi reduzida, indicando que outras vias, além da NADPH oxidase, devem ter sido utilizadas pelos neuroblastos, como a via mitocondrial, a das ciclooxigenases ou a da xantina oxidases (Harijih, et al 2014).

As EROs são principalmente confinadas intracelularmente, e a perturbação desse equilíbrio por uma infecção viral, como a pelo vírus Zika, aumenta a sua produção, seja por maior acúmulo ou efluxo de componentes que aumentam a concentração de EROs, conseqüentemente aumentando o estresse oxidativo (Reshi, et al. 2014).

Diferente do observado por nós, alguns autores mostraram que o atazanavir aumenta a produção de EROs. É possível que essas diferenças sejam pelo fato de que as células estudadas foram diferentes, enquanto nós avaliamos os neuroblastos, esses autores avaliaram as células das veias de cordão umbilical humano e adipócitos (Capel et al. 2012; Liu et al. 2016). Nossos dados mostraram que em neuroblastos o atazanavir isoladamente reduziu a quantidade de EROs presente na célula. Entretanto, o tratamento com o atazanavir aumentou a produção de EROs quando os neuroblastos estavam infectados com 0,1 MOI do vírus Zika, em ambas as concentrações do medicamento, sugerindo que o atazanavir poderia estar exercendo função antiviral, como é observada com outros inibidores de protease, como o lopinavir/ritonavir (Yuan et al. 2017).

O inibidor que foi utilizado em nossos experimentos, a diapocinina, inibe a atividade da NADPH oxidase, conseqüentemente inibindo uma das vias pelas quais a célula produz EROs. Trumbull e cols (2012) mostraram que a diapocinina apresentou efeito neuroprotetor. É possível a modulação parcial da produção de EROs pelo atazanavir possa ter participado dos mecanismos pelos quais o atazanavir melhorou a viabilidade dos neuroblastos infectados pelo vírus Zika, desde que as espécies reativas de oxigênio podem ser tóxicas para vírus, e sua ação sobre o vírus Zika pode ter diminuído seu efeito citopático para os neuroblastos. Entretanto, a recuperação parcial dessas moléculas pode ter permitido que os EROs permanecessem em uma concentração tal que pudessem exercer seu papel fisiológico protetor das funções que são necessárias para a sobrevivência dos neuroblastos.

As EROs são geradas pela atividade metabólica ou infecções, sendo importante para as funções fisiológicas das células, mas podem levar a morte celular por oxiptose, que é independente da ativação da via das caspases (Kesavardhana & Kannengati, 2018). Nossos dados mostraram que a inibição de EROs não modificou significativamente a viabilidade do neuroblasto,

entretanto, os radicais de oxigênio são importantes para o neurônio, visto que a inibição da sua produção pela diapocinina em camundongos que são modelos para a doença de Parkinson mostrou-se protetora e retardou os efeitos da degeneração neuronal (Dranka, et al. 2013).

Nossos dados mostraram que 0,1 MOI do vírus Zika diminuíram a produção das espécies reativas de nitrogênio (ERNs), e o atazanavir reverteu essa diminuição. Mostraram também que o NO é imprescindível para a viabilidade do neuroblastos, pois sua inibição pelo inibidor APDC mostrou-se devastadora para a célula, equiparando o grupo tratado com o grupo controle positivo utilizado.

O APDC inibe a produção do NO diretamente e também pela via do NF- κ B. Esse inibidor evita a indução do NO sintase por inibir a translação do ARN mensageiro da NOS. E também induz a apoptose em células da musculatura lisa, mas inibe a apoptose em culturas de células HL-60 de leucemia. O APDC é também um potente inibidor do NO pela formação de complexos de ferro mononitrosil com o ADPC.

Foi observado em neurônios que a inibição pelo APDC levou a uma diminuição de fosfato sintases. É possível que nos neuroblastos, que são células jovens em processo de maturação, a inibição dessa sintase possa ter contribuído para levar à perda da viabilidade da célula (Flavin, Jin & Daw, 2000).

O desenvolvimento neuronal e a maturação sináptica são dependentes de óxido nítrico, e as ERNs são imprescindíveis para o desenvolvimento dos neuroblastos (Gallo & Iadecola, 2011). Nossos dados mostraram que na presença do inibidor de NO, o APDC, a viabilidade dos neuroblastos apresentou uma queda acentuada. Entretanto, o neuroblastos não parece depender somente da via do óxido nítrico sintase (NOS), pois nossos dados mostram que mesmo na presença do inibidor ainda houve produção de ERNs. Uma provável hipótese para a manutenção dessa produção é o fato de que há diferentes isoformas das enzimas que estimulam a produção do NO a partir dos seus precursores, a NOS e a L-arginina, sendo que a produção do óxido nítrico pode ser induzida por suas 3 isoformas: NOS epitelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzido (iNOS). Uma possibilidade é que a nNOS continuou agindo por meio do cálcio pelo seu mecanismo calmodulina-dependente (Murad, 2008; Adams, Franco & Estevez, 2015).

O óxido nítrico (NO) é um composto gasoso que tem sido mostrado ser importante mensageiro em muitos sistemas e órgãos e particularmente no sistema nervoso central (Dzoljic et al. 2015). O NO é uma potente molécula mensageira com diversas funções fisiológicas, incluindo neurotransmissão, regulação do tônus vascular e morte de micro-organismos e células tumorais (Togashi e cols, 1997, Moncada e Higgs, 2006). Tem sido observado que essa molécula tem várias funções fisiológicas no sistema nervoso. No sistema nervoso central o NO tem efeito citoprotetor, entretanto pode ter efeito citotóxico na dependência de sua concentração. Em condições de inflamação por agentes infecciosos e em condições estimuladas pelo glutamato, a produção do NO pode aumentar rapidamente e atingir níveis muito elevados (Dzoljic et al. 2015). Ele é necessário em níveis fisiológicos para manter a integridade do neurônio, portanto é possível que sua inibição tenha contribuído para diminuir a viabilidade dos neuroblastos que observamos em nosso estudo.

Nossos dados mostrando que a viabilidade dos neuroblastos diminuiu na presença do inibidor da via do NF κ B, o JSH-23. A via do NF- κ B é fundamental para as funções das células sendo que sua ativação pode estar relacionada com a apoptose e indução de inflamação (Liu, et al 2017). A família de gene BAG (BCL-2 atanogene associada) está associada com efeitos antiapoptóticos e com a senescência da célula, e sua ativação é suprimida pelo NF- κ B, levando o neuroblasto a um estado de neurotoxicidade (Santiago, Almeida & Carrettiero, 2015), sendo esse um possível mecanismo pelo qual quando utilizamos o inibidor da via do NF κ B, a viabilidade dos neuroblastos diminuiu. Além disso, a via do NF- κ B também modula as vias de produção das citocinas inflamatórias, com possível atividade no neuroblasto.

Várias foram as citocinas estudadas no nosso trabalho, que apresentam funções importantes no sistema imunitário e nas células cerebrais. Nossos dados mostraram que a SK-N-B (2) produziu IL-1 β em condições fisiológicas, e que 1 MOI do vírus Zika aumentou a produção dessa citocina. A IL-1 β está presente em infecções e respostas inflamatórias, porém, também pode ser encontrada no cérebro em condições fisiológicas influenciando as funções neuronais (Merril & Benveniste, 1996; Yirmiya, Winocur & Goshen, 2002). Huang e cols. (2011) observaram que em neurônios de camundongos, níveis baixos da

IL-1 β são suficientes para induzir a fosforilação da SRC, que é uma proteína-tirosina cinase responsável por proliferação, diferenciação e motilidade da célula. Nossos dados mostraram que a inibição da produção de radicais de oxigênio pelo APDC aumentou a produção de IL-1 β pelos neuroblastos. O estresse causado na célula pela inibição das espécies reativas de nitrogênio, que são necessárias para as funções da célula, pode ter ocasionado o aumento da produção de IL-1 β observado por nós. Tetsuka e cols. (1996), utilizando células mesangiais de ratos observaram que o APDC inibiu completamente a expressão de iNOS dependente de IL-1 β . É provável que a inibição da NOS estimulou uma maior secreção da IL-1 β como uma resposta ao estresse do neuroblasto.

A infecção pelo vírus Zika também aumentou a produção do fator de necrose tumoral pelos neuroblastos. O FNT é uma importante citocina inflamatória, ativando diversas cascatas de sinalizações que culminam em processos como a viabilidade celular, expressão de genes e homeostase. No cérebro, o FNT pode ser produzido pela micróglia, astrócitos e neurônios (Kinouchi et al. 1991; Park & Bowers, 2011). Observamos que naturalmente, mesmo em pequena quantidade, existe a produção de FNT pelas neuroblastos SK-N-BE (2), e que na presença de 1 MOI do vírus Zika houve aumento da sua produção. O atazanavir reduziu o aumento que tinha ocorrido da produção do FNT após exposição a 1 MOI do vírus Zika. Alves e cols. (2015) também observaram que o atazanavir pode ter efeito modulador sobre células do sistema imunitário e efeito direto na redução do FNT pelo atazanavir foi observado no sobrenadante de culturas de monócitos infectados pelo SarsCoV2 por Fintelman-Rodrigues e cols. (2020).

Nossos dados mostram uma produção da IL-6 em níveis muito elevados em comparação com as outras citocinas inflamatórias, evidenciando assim sua importância para o neuroblasto, e tanto o atazanavir quanto os vírus isolados não foram capazes de modificar a sua produção. Entretanto, o atazanavir diminuiu a produção da IL-6 quando se encontravam na cultura 0,1 MOI do vírus ZIKA tratados com 3 μ M do atazanavir. A IL-6 é imprescindível na formação e maturação neuronal, sendo crítica na neurogênese. É uma molécula com efeitos ambíguos, que conforme a sua forma de ativação pode ser benéfica ou patogênica (Erta, Quintana & Hidalgo, 2012). Como existe uma alta produção

da IL-6 e não houve redução da viabilidade dos neuroblastos, é possível que a citocina tenha sido induzida nas células SK-N-BE (2) pela via clássica, associada com a regeneração neuronal (Routhaug, 2016).

Nossos dados mostram que a IL-12p70 também foi produzida pelos neuroblastos e que 1 MOI de vírus Zika reduziu essa produção, cuja diminuição foi revertida posteriormente pelo atazanavir, provavelmente por uma ação direta sobre o vírus. A IL-12p70 induz resposta a patógenos intracelulares, e sua produção por fagócitos é estimulada pela ligação ao TLR ou outro tipo de receptor de reconhecimento padrão (Podlaski et al. 1992). Wood e cols. (2015) observaram redução da viabilidade de neurônios na presença da IL-12p70, o que não foi observado por nós.

Nossos dados mostram que o neuroblasto produz pequenas quantidades da IL-10, semelhante aos observados para o FNT, IL-12p70 e IL-1 β , sugerindo que provavelmente esse seja o nível fisiológico de expressão dessas citocinas para o tipo celular SK-N-BE (2). A IL-10 atenua as reações inflamatórias e suprime as respostas imunes (Puig et al. 2013). Foi observado que sua presença pode reduzir a apoptose em neurônios (Sharma et al. 2011). Tanto o vírus quanto o atazanavir isolados não modificaram a produção dessa citocina pelos neuroblastos.

Nossos dados mostraram altos níveis de produção da IL-8 pelos neuroblastos, assim como a IL-6. A IL-8 é um importante quimiotático para neutrófilos, e seus níveis podem estar aumentados no sistema nervoso devido a infecções e neoplasias malignas, porém, ela também está associada a fatores neurotróficos, podendo estar envolvida na sobrevivência e manutenção de neurônios (Kossmann et al. 1997). Araújo & Cotman (1993) observaram em culturas de neurônios hipocámpais que a IL-8 aumentou a sobrevivência dessas células em 123%, sugerindo que esta quimiocina pode apresentar um papel imprescindível na maturação e manutenção de neuroblastos. Quando o neuroblasto esteve na presença de 0,1 MOI do vírus Zika em conjunto com o atazanavir (3 μ M) a expressão dessa quimiocina foi reduzida, provavelmente por uma redução da viabilidade da célula observada pelas análises de viabilidade dos neuroblastos pelo teste do MTT. Observamos que o APDC aumentou a expressão de IL-8. Diferentemente, Muñoz e cols. (1996) ao avaliar macrófagos, notaram que a IL-8 era inibida pelo APDC. Provavelmente a via utilizada por macrófagos é

diferente da utilizada por neuroblastos para a produção de IL-8. Entretanto, nossos dados mostraram que a diapocinina reduziu a expressão da quimiocina. Enquanto as EROs são importantes na produção da IL-8 as ERNs a reduzem, porém, não inibiram a sua produção pelos neuroblastos.

Nossos dados mostraram que o atazanavir poderia ser uma droga promissora como tratamento para prevenir a microcefalia em fetos de mulheres gestantes infectadas pelo vírus Zika. Em comparação com drogas semelhantes, o atazanavir mostrou uma menor inibição na captação de glicose, sugerindo que sua utilização como terapêutica preventiva na infecção pelo vírus Zika, poderia causar menos efeitos colaterais que outros antiretrovirais (Noor, et al 2006).

Avaliar se o medicamento atazanavir poderia ser eficaz na proteção da viabilidade das células é um tema de extrema importância, visto que é um medicamento liberado para grávidas, e que a atividade anti-viral para o vírus Zika já foi observada para o lopinavir/ritonavir, que também são inibidores de protease com certas semelhanças ao atazanavir (Yuan, et al 2017). Yuan e cols. (2017) observaram efeito antiviral do lopinavir/ritonavir, o que sugere que esse medicamento poderia melhorar a viabilidade dos neuroblastos por diminuir a carga viral. Entretanto, deve ser levado em consideração que na dosagem de 3 μ M observamos redução da viabilidade dos neuroblastos, indicando que a dose mais elevada foi tóxica e que o tratamento teria que ser limitado a uma dose menor, como observamos utilizando 1 μ M.

Em conclusão, nossos dados mostraram resultados promissores do atazanavir como uma possível droga que poderia ser utilizada com o objetivo de diminuir o risco de morte dos neuroblastos em gestantes infectados pelo vírus Zika. E sugerem que o medicamento deveria ser melhor avaliado para verificar se sua ação protetora para os neuroblastos persistiria em mulheres gestantes infectadas pelo vírus Zika, e se sua utilização poderia prevenir o desenvolvimento da microcefalia no feto.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- 1- Nossos dados de microscopia eletrônica de transmissão confirmam a infecção dos neuroblastos pelo vírus Zika.
- 2- Em nossos dados, observamos que o vírus Zika, em ambas as proporções diminuiu a viabilidade dos neuroblastos. Este dado sugere o que pode ocorrer na infecção de gestantes, provavelmente a morte neuronal tenha ocorrido pela destruição dessas células pelo vírus Zika (Hughes et al. 2016);
- 3- O atazanavir na concentração de 1 μ M mostrou-se protetor do efeito de toxicidade causado pelo vírus Zika, esse efeito na viabilidade dos neuroblastos foi ainda mais evidente no MOI 1 do vírus. Os dados sugerem que o tratamento com atazanavir poderia ter um efeito protetor na destruição neuronal causada pelo vírus, que culminariam na microcefalia. Porém, são dados observados *in vitro*, sendo assim necessários estudos *in vivo* para melhor avaliação do efeito protetor.
- 4- Já para a concentração de 3 μ M, nossos dados sugerem que há efeito tóxico para os neuroblastos quando tratado isoladamente e acentuando o efeito tóxico quando na presença do vírus Zika. Então, o atazanavir nessa concentração não é viável para o tratamento da infecção devido aos seus efeitos tóxicos nos neuroblastos. Entretanto, os dados evidenciam um possível tratamento adjuvante em pacientes acometidos pelo neuroblastoma.
- 5- Nos dados apresentados no experimento de anexina/iodeto de propídio, observamos que o atazanavir na concentração 1 μ M reduziu a porcentagem de células em apoptose quando associado ao vírus Zika na proporção 0,1. Já para as células em necrose, nossos dados evidenciam que quanto maior a proporção do vírus, maior é a presença de necrose.
- 6- O atazanavir (3 μ M) aumentou a quantidade de células com irregularidades na permeabilidade da membrana, indicando necrose, este efeito ficou evidente na presença do vírus Zika (MOI 0,1).
- 7- Nossos dados sugerem um possível efeito protetor do atazanavir na concentração 1 μ M devido a sua capacidade de reduzir a expressão da

caspase-3. Dessa forma, a redução na expressão dessa proteína pode ser um fator protetor não somente na patologia causada pelo vírus Zika, mas também pelo Alzheimer, onde foi mostrado que essa caspase é uma das responsáveis pela clivagem da proteína precursora do amiloide beta A4 (Gervais et al. 1999).

- 8- O vírus Zika reduz a produção de EROs pelos neuroblastos e o atazanavir pode reverter parcialmente essa redução. Interessantemente, nossos dados mostraram que a redução da produção das EROs reduziu parcialmente a toxicidade do vírus para os neuroblastos na proporção 0,1. Esses dados sugerem que a via de produção dos radicais de oxigênio pode interferir na ação do vírus sobre os neuroblastos.
- 9- A produção de ERNs é importante para a viabilidade dos neuroblastos, efeito que ficou evidente quando esta produção foi inibida.
- 10- Nossos dados sugerem que os neuroblastos SK-N-BE (2) possuem uma baixa expressão de IL-1 β , e que esta aumentou sua expressão na presença do vírus Zika (MOI 1) e na presença do inibidor de ERNs, sendo assim, a redução na viabilidade da célula deve-se provavelmente a inibição na produção de ON e ao aumento da expressão da citocina inflamatória, sugerindo estresse inflamatório.
- 11- Para o TNF, observamos que sua expressão pelos neuroblastos SK-N-BE (2) é baixa, e que na presença do vírus (MOI 1) existe aumento de sua produção. Interessantemente, o atazanavir mostrou um provável efeito imunomodulador ou antiviral ao auxiliar na redução da expressão desta citocina.
- 12- Observamos uma alta expressão da IL-6 pelos neuroblastos, isso provavelmente se dá pela sua importância na neuroproteção e neuromodulação (Rothaug et al. 2016).
- 13- A IL-12p70 também possui uma baixa expressão neste neuroblasto, e o vírus (MOI 1) é capaz de reduzir essa produção.
- 14- Observamos também alta produção da IL-8 pela SK-N-BE (2). Esta quimiocina possui efeitos angiogênicos, a sua alta expressão no neuroblasto pode ser pela sua ainda maturação (Ryu et al. 2015).

Em síntese, sugerimos que o atazanavir na concentração 1 μ M pode ser um medicamento viável na estabilização da infecção pelo vírus Zika, provavelmente podendo auxiliar na redução de casos de microcefalia, sendo necessários mais estudos para evidenciar essa possibilidade. As vias de inflamação ERNs e EROs são importantes na manutenção da célula. As citocinas inflamatórias são produzidas pelo neuroblasto SK-N-BE (2), sendo a IL-6 e a quimiocina IL-8 as de maior expressão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

The history of zika virus [Internet]. [cited 2021 Feb 19]. Available from: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-history-of-zika-virus>.

Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. 1969;

Adams L, Franco MC, Estevez AG. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Exp Biol Med*. 2015;240:711–717.

Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, et al. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* [Internet]. 1998 [cited 2021 Feb 15];351:882–883. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9525374/>.

Adigun R, Bhimji SS. Necrosis, Cell (Liquefactive, Coagulative, Caseous, Fat, Fibrinoid, and Gangrenous) [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2018 [cited 2021 Jan 29]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28613685>.

Akey DL, Brown WC, Dutta S, et al. Flavivirus NS1 Structures Reveal Surfaces for Associations with Membranes and the Immune System. *Science* (80-) [Internet]. 2014;343:881 LP – 885. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/343/6173/881.abstract>.

Alves ÉAR, de Miranda MG, Borges TK, et al. Anti-HIV drugs, lopinavir/ritonavir and atazanavir, modulate innate immune response triggered by *Leishmania* in macrophages: The role of NF- κ B and PPAR- γ . *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2015;24:314–324. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576914005037>.

Amorim JH, Alves RP dos S, Boscardin SB, et al. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. *Virus Res* [Internet]. 2014 [cited 2019 Feb 19];181:53–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170214000033>.

Araujo DM, Cotman CW. Trophic effects of interleukin-4, -7 and -8 on hippocampal neuronal cultures: potential involvement of glial-derived factors. *Brain Res* [Internet]. 1993 [cited 2021 Feb 18];600:49–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000689939390400H>.

Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med* [Internet]. 2010 [cited

2021 Feb 19];207:793–806. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20308361/>.

Baer A, Kehn-Hall K. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *J Vis Exp* [Internet]. 2014; Available from: <http://www.jove.com/video/52065/viral-concentration-determination-through-plaque-assays-using>.

Baud D, Gubler DJ, Schaub B, et al. An update on Zika virus infection. *www.thelancet.com* [Internet]. 2017 [cited 2019 Feb 24];390. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/>.

Beadling C, Slifka MK. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27 [Internet]. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. Springer; 2006 [cited 2021 Feb 19]. p. 15–24. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00005-006-0002-6>.

Beaver JT, Lelutiu N, Habib R, et al. Evolution of Two Major Zika virus Lineages: implications for Pathology, immune Response, and vaccine Development. 2018 [cited 2019 Mar 5];9:1. Available from: www.frontiersin.org.

Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, et al. Open Access Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. 2007 [cited 2019 Mar 5]; Available from: <http://ccforum.com/content/11/2/R49>.

Braun DL, Kouyos R, Oberle C, et al. A Novel Acute Retroviral Syndrome Severity Score Predicts the Key Surrogate Markers for HIV-1 Disease Progression. López-Galíndez C, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2021 Feb 19];9:e114111. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0114111>.

Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, et al. Reactive oxygen species: From health to disease [Internet]. *Swiss Med. Wkly. Swiss Med Wkly*; 2012 [cited 2021 Feb 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22903797/>.

Caccamo A, Branca C, Piras IS, et al. Necroptosis activation in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* [Internet]. 2017 [cited 2021 Jan 29];20:1236–1246. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28758999/>.

Capel E, Auclair M, Caron-Debarle M, et al. Effects of ritonavir-boosted darunavir, atazanavir and lopinavir on adipose functions and insulin sensitivity in murine

and human adipocytes. *Antivir Ther* [Internet]. 2012 [cited 2020 Aug 27];17:549–556. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22293506/>.

Chattopadhyay N, Zastre J, Wong HL, et al. Solid lipid nanoparticles enhance the delivery of the HIV protease inhibitor, atazanavir, by a human brain endothelial cell line. *Pharm Res* [Internet]. 2008 [cited 2021 Feb 17];25:2262–2271. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-008-9615-2>.

Chi H, Chang HY, Sang TK. Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases [Internet]. *Int. J. Mol. Sci. MDPI AG*; 2018 [cited 2021 Jan 28]. Available from: </pmc/articles/PMC6213751/?report=abstract>.

Costas MA, Rubio MF. Autofagia, una estrategia de supervivencia celular. *Med* [Internet]. 2017 [cited 2021 Feb 19];314–320. Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802017000400011.

Cruvinel W de M, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol* [Internet]. 2010 [cited 2021 Feb 19];50:434–447. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042010000400008&lng=pt&nrm=iso&tlng=en.

Daniels BP, Kofman SB, Smith JR, et al. The Nucleotide Sensor ZBP1 and Kinase RIPK3 Induce the Enzyme IRG1 to Promote an Antiviral Metabolic State in Neurons. *Immunity* [Internet]. 2019 [cited 2021 Feb 16];50:64-76.e4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.017>.

Dick GWA. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;

Dick GWA. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;

Dick G, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;

Dixit E, Kagan JC. Intracellular Pathogen Detection by RIG-I-Like Receptors. *Adv Immunol.* 2013;

Dranka BP, Gifford A, Ghosh A, et al. Diapocynin prevents early Parkinson's disease symptoms in the leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2R1441G) transgenic mouse. *Neurosci Lett* [Internet]. 2013 [cited 2021 Feb 20];549:57–62. Available from: [/pmc/articles/PMC3729885/](#).

Elong Ngonu A, Vizcarra EA, Tang WW, et al. Mapping and Role of the CD8+T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. *Cell Host Microbe*. 2017;

Epidemiológico B, Editorial Osnei Okumoto C, Maria Feitosa Brito S, et al. N° 36 | Ago. 2018;49.

Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system [Internet]. *Int. J. Biol. Sci.* Ivyspring International Publisher; 2012 [cited 2021 Feb 17]. p. 1254–1266. Available from: [/pmc/articles/PMC3491449/](#).

Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. 2010 [cited 2019 Mar 1]. p. 57–72. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-411-1_4.

Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, Lima CR, et al. Atazanavir inhibits SARS-CoV-2 replication and pro-inflammatory cytokine production [Internet]. *bioRxiv*. bioRxiv; 2020 [cited 2021 Feb 17]. p. 2020.04.04.020925. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.04.04.020925>.

Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. American Lung Association; 2002 [cited 2021 Feb 17]. p. S4–S8. Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.2206007>.

Galic MA, Riazi K, Pittman QJ. Cytokines and brain excitability [Internet]. *Front. Neuroendocrinol.* PMC Canada manuscript submission; 2012 [cited 2021 Feb 19]. p. 116–125. Available from: [/pmc/articles/PMC3547977/](#).

Gallo EF, Iadecola C. Neuronal nitric oxide contributes to neuroplasticity-associated protein expression through cGMP, protein kinase G, and extracellular signal-regulated kinase. *J Neurosci* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jan 29];31:6947–6955. Available from: [/pmc/articles/PMC3110776/?report=abstract](#).

Gee K, Guzzo C, Che Mat N, et al. The IL-12 Family of Cytokines in Infection, Inflammation and Autoimmune Disorders. *Inflamm Allergy-Drug Targets* [Internet].

2009 [cited 2019 Mar 4];8:40–52. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5281&volume=8&issue=1&spage=40>.

Gorshkov K, Shiryayev SA, Fertel S, et al. Zika virus: Origins, pathological action, and treatment strategies [Internet]. *Front. Microbiol. Frontiers Media S.A.*; 2019 [cited 2021 Feb 19]. p. 3252. Available from: <http://www.who>.

Gratton R, Agrelli A, Tricarico PM, et al. Autophagy in zika virus infection: A possible therapeutic target to counteract viral replication. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 [cited 2020 Aug 27];20. Available from: </pmc/articles/PMC6429311/?report=abstract>.

Grifoni A, Pham J, Sidney J, et al. Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. Dermody TS, editor. *J Virol* [Internet]. 2017;91. Available from: <http://jvi.asm.org/content/91/24/e01469-17.abstract>.

Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. 2015 [cited 2019 Feb 24]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1128>.

Hikawa N, Ishikawa Y, Takenaka T. Interleukin-12 p40-homodimer production in sensory dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* [Internet]. 2004 [cited 2021 Feb 17];129:75–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15489030/>.

Hirschel T, Steffen H, Pecoul V, et al. Blinded by Zika? A missed HIV diagnosis that resulted in optic neuropathy and blindness: a case report. *BMC Res Notes* [Internet]. 2017;10:664. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2970-5>.

Huang Y, Smith DE, Ibáñez-Sandoval O, et al. Neuron-specific effects of interleukin-1 β are mediated by a novel isoform of the IL-1 receptor accessory protein. *J Neurosci* [Internet]. 2011 [cited 2021 Feb 19];31:18048–18059. Available from: </pmc/articles/PMC3261076/>.

Hughes BW, Addanki KC, Sriskanda AN, et al. Infectivity of Immature Neurons to Zika Virus: A Link to Congenital Zika Syndrome-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). *EBIOM* [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 24];10:65–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.026>.

Huits R, De Smet B, Ariën KK, et al. Zika virus in semen: a prospective cohort study of symptomatic travellers returning to Belgium. *Bull World Heal Organ* [Internet].

2017 [cited 2019 Feb 24]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5710082/pdf/BLT.17.181370.pdf>.

Iolascon A, Borriello A, Giordani L, et al. Caspase 3 and 8 deficiency in human neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* [Internet]. 2003 [cited 2021 Feb 19];146:41–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14499695/>.

Kam Y-W, Leite JA, Lum F-M, et al. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus–Infected Patients in Brazil. *J Infect Dis* [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 5];216:172–181. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/216/2/172/3858563>.

Kamiyama N, Soma R, Hidano S, et al. Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice. *Antiviral Res.* 2017;

Kaushik S, Singh R, Cuervo AM. Autophagic pathways and metabolic stress. *Diabetes, Obes Metab* [Internet]. 2010 [cited 2021 Feb 16];12:4–14. Available from: </pmc/articles/PMC3994321/>.

Kesavardhana S, Kanneganti TD. Stressed-out ROS take a silent death route [Internet]. *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group; 2018 [cited 2021 Feb 19]. p. 103–105. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29348507/>.

Kinouchi K, Brown G, Pasternak G, et al. Identification and characterization of receptors for tumor necrosis factor- α in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1991 [cited 2021 Feb 17];181:1532–1538. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1662500/>.

Kole AJ, Annis RP, Deshmukh M. Mature neurons: equipped for survival. [Internet]. *Cell Death Dis.* Cell Death Dis; 2013 [cited 2021 Jan 29]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23807218/>.

Kossmann T, Stahel PF, Lenzlinger PM, et al. Interleukin-8 released into the cerebrospinal fluid after brain injury is associated with blood-brain barrier dysfunction and nerve growth factor production. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 1997 [cited 2021 Feb 18];17:280–289. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1097/00004647-199703000-00005>.

Kumar A, Hou S, Airo AM, et al. Zika virus inhibits type- I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep* [Internet]. 2016;17:1766 LP – 1775. Available from: <http://embor.embopress.org/content/17/12/1766.abstract>.

Kuno G, Chang GJJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol*. 2007;

Lee HJ, Yoon YS, Lee SJ. Mechanism of neuroprotection by trehalose: Controversy surrounding autophagy induction [Internet]. *Cell Death Dis*. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2021 Feb 20]. p. 1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-018-0749-9>.

Lee SI, Jeong YJ, Yu AR, et al. Carfilzomib enhances cisplatin-induced apoptosis in SK-N-BE(2)-M17 human neuroblastoma cells. *Sci Rep* [Internet]. 2019 [cited 2021 Feb 16];9:1–14. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41527-0>.

Lin H-H, Yip B-S, Huang L-M, et al. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2018 [cited 2019 Feb 24];36:47–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975017301155>.

Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 [cited 2021 Feb 17];370:455–465. Available from: [/pmc/articles/PMC4035222/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24711111/).

MacNamara FN. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1954;

Marengo B, Raffaghello L, Pistoia V, et al. Reactive oxygen species: Biological stimuli of neuroblastoma cell response. *Cancer Lett*. Elsevier Ireland Ltd; 2005. p. 111–116.

März P, Cheng JG, Gadiant RA, et al. Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998 [cited 2021 Feb 19];95:3251–3256. Available from: <https://www.pnas.org/content/95/6/3251>.

Mécharles S, Herrmann C, Poullain P, et al. Acute myelitis due to Zika virus infection. *www.thelancet.com* [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 24];387. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/>.

Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, et al. The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. [cited 2019 Feb 19]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.009>.

Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: Helpful and harmful [Internet]. *Trends Neurosci*. Elsevier Ltd; 1996 [cited 2021 Feb 17]. p. 331–338. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8843602/>.

Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, et al. CD14+CD16+monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol*. 2017;

Milton VJ, Sweeney ST. Oxidative stress in synapse development and function. *Dev Neurobiol* [Internet]. 2012 [cited 2021 Jan 29];72:100–110. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21793225/>.

Miner JJ, Diamond MS. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism [Internet]. *Cell Host Microbe*. Cell Press; 2017 [cited 2021 Feb 19]. p. 134–142. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28182948/>.

Miner JJ, Diamond MS. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe*. 2017.

Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8:227–241.

Muñoz C, Pascual-Salcedo D, Del M, et al. Pyrrolidine Dithiocarbamate Inhibits the Production of Interleukin-6, Interleukin-8, and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor by Human Endothelial Cells in Response to Inflammatory Mediators: Modulation of NF-KB and AP-1 Transcription Factors [Internet]. [cited 2021 Feb 18]. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/88/9/3482/623289/3482.pdf>.

Murad F. Nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate signaling in the eye. *Can J Ophthalmol* [Internet]. 2008 [cited 2021 Feb 15];43:291–294. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18443613/>.

Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [Internet]. *Nat. Rev. Immunol*. Nat Rev Immunol; 2011 [cited 2021 Feb 19]. p. 723–737. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21997792/>.

Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2021 Feb 19];12:222–230. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21151103/>.

Nam Nguyen H, Qian X, Song H, et al. Neural stem cells attacked by Zika virus. 2016 [cited 2019 Feb 24]; Available from: www.nature.com/cr.

Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys* [Internet]. 2013 [cited 2021 Feb 19];42:443–468. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23495970/>.

Noor MA, Flint OP, Maa J-F, et al. Effects of atazanavir/ritonavir and lopinavir/ritonavir on glucose uptake and insulin sensitivity: demonstrable differences in vitro and clinically. *AIDS* [Internet]. 2006 [cited 2020 Nov 2];20:1813–1821. Available from: <http://journals.lww.com/00002030-200609110-00004>.

Nunes ML, Carlini CR, Marinowic D, et al. Microcephaly and Zika virus: A clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. *J. Pediatr. (Rio. J)*. 2016.

Nzuza S, Zondi S, Owira PMO. Naringin prevents HIV-1 protease inhibitors-induced metabolic complications in vivo. *PLoS One* [Internet]. 2017 [cited 2021 Feb 15];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29121676/>.

Ojha CR, Rodriguez M, Lapierre J, et al. Complementary mechanisms potentially involved in the pathology of Zika virus [Internet]. *Front. Immunol. Frontiers Media S.A.*; 2018 [cited 2021 Feb 19]. p. 2340. Available from: [/pmc/articles/PMC6196287/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3166287/).

Oliveira JH de, Vio O, Talyuli AC, et al. Catalase protects *Aedes aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika. 2017 [cited 2019 Feb 26]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005525>.

Oswald MCW, Garnham N, Sweeney ST, et al. Regulation of neuronal development and function by ROS [Internet]. *FEBS Lett. Wiley Blackwell*; 2018 [cited 2020 Aug 27]. p. 679–691. Available from: [/pmc/articles/PMC5888200/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/).

Park KM, Bowers WJ. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction [Internet]. *Cell. Signal. NIH Public Access*; 2010 [cited 2021 Feb 17]. p. 977–983. Available from: [/pmc/articles/PMC2860549/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20000000/).

Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation [Internet]. *Antioxidants Redox Signal. Mary Ann Liebert, Inc.*; 2014 [cited 2021 Feb 19]. p. 460–473. Available from: [/pmc/articles/PMC3894687/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25000000/).

Pérez-De Puig I, Miró F, Salas-Perdomo A, et al. IL-10 deficiency exacerbates the brain inflammatory response to permanent ischemia without preventing resolution of the lesion. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2013 [cited 2021 Feb 17];33:1955–1966. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24022622/>.

Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:49–62.

Piliero PJ. A novel once-daily protease inhibitor [Internet]. *Drugs of Today. Drugs Today (Barc)*; 2004 [cited 2021 Feb 19]. p. 901–912. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15645003/>.

Pugazhenth S, Zhang Y, Bouchard R, et al. Induction of an Inflammatory Loop by Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α Involves NF- κ B and STAT-1 in Differentiated Human Neuroprogenitor Cells. *PLoS One* [Internet]. 2013 [cited 2021 Feb 19];8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23922745/>.

Pyrko P, Kardosh A, Wang W, et al. HIV-1 Protease Inhibitors Nelfinavir and Atazanavir Induce Malignant Glioma Death by Triggering Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancer Res* [Internet]. 2007 [cited 2021 Feb 16];67:10920–10928. Available from: www.aacrjournals.org.

Ramani T, Auletta CS, Weinstock D, et al. Cytokines. *Int J Toxicol* [Internet]. 2015 [cited 2019 Mar 4];34:355–365. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1091581815584918>.

Reshi ML, Su YC, Hong JR. RNA viruses: ROS-mediated cell death. *Int J Cell Biol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Feb 20];2014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24899897/>.

Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis [Internet]. *Trends Mol. Med. Trends Mol Med*; 2006 [cited 2021 Jan 29]. p. 440–450. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16899408/>.

Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. Elsevier B.V.*; 2016. p. 1218–1227.

Rouse BT, Sehrawat S. Immunity and immunopathology to viruses: What decides the outcome? *Nat. Rev. Immunol*. 2010.

Santiago FE, Almeida MC, Carrettiero DC. BAG2 Is Repressed by NF- κ B Signaling, and Its Overexpression Is Sufficient to Shift A β 1-42 from Neurotrophic to Neurotoxic in Undifferentiated SH-SY5Y Neuroblastoma. *J Mol Neurosci* [Internet]. 2015 [cited 2021 Feb 20];57:83–89. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12031-015-0579-5>.

Schmetterer KG, Pickl WF. The IL-10/STAT3 axis: Contributions to immune tolerance by thymus and peripherally derived regulatory T-cells [Internet]. *Eur. J. Immunol.* Wiley-VCH Verlag; 2017 [cited 2021 Feb 19]. p. 1256–1265. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28631311/>.

Sharma S, Yang B, Xi X, et al. IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways. *Brain Res* [Internet]. 2011 [cited 2021 Feb 17];1373:189–194. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21138740/>.

Shi Y, Gao GF. Structural Biology of the Zika Virus. *Trends Biochem. Sci.* 2017.

Simanjuntak Y, Liang J-J, Chen S-Y, et al. Ebselen alleviates testicular pathology in mice with Zika virus infection and prevents its sexual transmission. 2018 [cited 2019 Feb 26]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006854>.

Slon Campos JL, Mongkolsapaya J, Screaton GR. The immune response against flaviviruses. *Nat Immunol* [Internet]. 2018;19:1189–1198. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0210-3>.

Smithburn KC. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. *J Immunol.* 1952;

Snider WD, Elliott JL, Yan Q. Axotomy-induced neuronal death during development. *J Neurobiol* [Internet]. 1992 [cited 2021 Jan 29];23:1231–1246. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/neu.480230913>.

Souza BSF, Sampaio GLA, Pereira CS, et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Sci Rep* [Internet]. 2016 [cited 2021 Feb 19];6:1–13. Available from: www.nature.com/scientificreports.

Suharti C, van Gorp ECM, Setiati TE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thromb Haemost* [Internet].

2002 [cited 2019 Mar 4];87:42–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11858187>.

Suzukawa K, Miura K, Mitsushita J, et al. Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 [cited 2021 Feb 17];275:13175–13178. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10788420/>.

Szelényi J. Cytokines and the central nervous system [Internet]. *Brain Res. Bull. Brain Res Bull*; 2001 [cited 2021 Feb 19]. p. 329–338. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11306183/>.

Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy* [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 5];8:959–970. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/imt-2016-0020>.

Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarchi L, et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Feb 19];205:269–273. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26702627/>.

Terzian ACB, Schanoski AS, Mota MT de O, et al. Viral Load and Cytokine Response Profile Does Not Support Antibody-Dependent Enhancement in Dengue-Primed Zika Virus-Infected Patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 5];65:1260–1265. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29017246>.

Tetsuka T, Baier LD, Morrison AR. Antioxidants Inhibit Interleukin-1-induced Cyclooxygenase and Nitric-oxide Synthase Expression in Rat Mesangial Cells EVIDENCE FOR POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION*. *J. Biol. Chem.* 1996.

Tian H, Ji X, Yang X, et al. The crystal structure of Zika virus helicase: basis for antiviral drug design. *Protein Cell* [Internet]. 2016;7:450–454. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0275-4>.

Tiwari M, Lopez-Cruzan M, Morgan WW, et al. Loss of caspase-2-dependent apoptosis induces autophagy after mitochondrial oxidative stress in primary cultures of young adult cortical neurons. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jan 29];286:8493–8506. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21216964/>.

Toné S, Sugimoto K, Tanda K, et al. Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. *Exp Cell Res* [Internet]. 2007 [cited 2021 Jan 29];313:3635–3644. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17643424/>.

Tricoire L, Vitalis T. Neuronal nitric oxide synthase expressing neurons: A journey from birth to neuronal circuits [Internet]. *Front. Neural Circuits*. Frontiers; 2012 [cited 2021 Jan 29]. p. 1–36. Available from: www.frontiersin.org.

Trumbull KA, Mcallister D, Gandelman MM, et al. Diapocynin and apocynin administration fails to significantly extend survival in G93A SOD1 ALS mice. *Neurobiol Dis*. 2012;45:137–144.

Van Den Pol AN, Mao G, Yang Y, et al. Neurobiology of Disease Zika Virus Targeting in the Developing Brain. 2017 [cited 2019 Feb 24]; Available from: <http://www.cdc.gov/zika/geo/>.

Vlahakis SR, Bennett SAL, Whitehead SN, et al. HIV protease inhibitors modulate apoptosis signaling in vitro and in vivo. *Apoptosis*. 2007;12:969–977.

Wong HR, Nowak JE, Standage SW, et al. Sepsis. *Pediatr Crit Care* [Internet]. Elsevier; 2011 [cited 2019 Mar 5]. p. 1413–1429. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032307307310103X>.

Wood LB, Winslow AR, Proctor EA, et al. Identification of neurotoxic cytokines by profiling Alzheimer's disease tissues and neuron culture viability screening. *Sci Rep* [Internet]. 2015 [cited 2021 Feb 17];5:1–13. Available from: www.nature.com/scientificreports.

Yan N, Chen ZJ. Intrinsic antiviral immunity. *Nat. Immunol*. 2012.

Yang YP, Hu LF, Zheng HF, et al. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators [Internet]. *Acta Pharmacol. Sin*. Nature Publishing Group; 2013 [cited 2021 Feb 16]. p. 625–635. Available from: www.chinaphar.com.

Yirmiya R, Winocur G, Goshen I. Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. *Neurobiol Learn Mem* [Internet]. 2002 [cited 2021 Feb 17];78:379–389. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12431424/>.

Yuan S, Chan JF-W, den-Haan H, et al. Structure-based discovery of clinically approved drugs as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors that potently inhibit Zika virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res* [Internet]. 2017 [cited 2019 Feb 20];145:33–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354217301754>.

Zhang C, Feng T, Cheng J, et al. Structure of the NS5 methyltransferase from Zika virus and implications in inhibitor design. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017;492:624–630. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X16319635>.

Zhang Z, Rong L, Li YP. Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis [Internet]. *Oxid. Med. Cell. Longev. NLM (Medline)*; 2019 [cited 2020 Aug 27]. p. 1409582. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31531178/>.