

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

LUCAS FRAGA FRIAÇA ALBUQUERQUE

**EFEITO DA CURCUMINA NO TRATAMENTO DE MICRÓGLIAS INFECTADAS
PELO VÍRUS ZIKA**

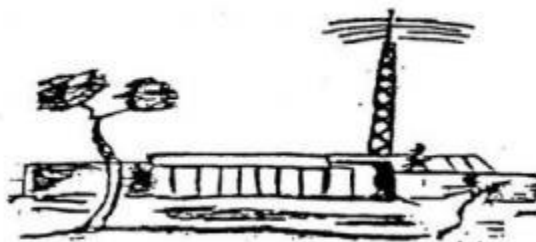
BRASÍLIA, DF
2021

**EFEITO DA CURCUMINA NO TRATAMENTO DE MICRÓGLIAS
INFECTADAS PELO VÍRUS ZIKA**

LUCAS FRAGA FRIAÇA ALBUQUERQUE

Dissertação 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 Mestre

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



Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

FA757e Fraga Friaça Albuquerque, Lucas
EFEITO DA CURCUMINA NO TRATAMENTO DE MICRÓGLIAS
INFECTADAS PELO VÍRUS ZIKA / Lucas Fraga Friaça Albuquerque;
orientador Tatiana Karla dos Santos Borges. -- Brasília,
2021.
197 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2021.

1. Zika. 2. curcumina. 3. neuroinflamação. 4. autofagia.
5. micróglia. I. dos Santos Borges, Tatiana Karla, orient.
II. 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-Dedit, processo número: 440844-2016-9, e com o apoio de bolsa de estudos concedida pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e por todas as oportunidades que Ele me deu ao longo desses anos.

Agradeço à minha família, em especial aos meus avós, Wilknsn da Silveira Friaça e Warley Fraga Friaça, e à minha mãe, Wany Fraga Friaça. Só foi possível realizar este trabalho graças ao apoio e incentivo de vocês. Obrigado por todos os ensinamentos que me deram ao longo da vida, principalmente por me ensinarem a nunca desistir dos meus sonhos.

Agradeço imensamente à minha orientadora e amiga, professora Dr.^a Tatiana Karla dos Santos Borges. Como sempre digo: obrigado por ter me recebido no laboratório mesmo quando tirei nota baixa na sua matéria. Agradeço não somente por todo o conhecimento que me passou sobre imunologia, mas também por todos os conselhos e ensinamentos de vida que a senhora me deu. Sou eternamente grato por todos esses seis anos de caminhada onde fizemos muitos experimentos, viramos muitas noites em frente ao citômetro e conhecemos quase todos os cafés da Asa Norte. Obrigado também por não me expulsar do laboratório quando apareci por lá vestido de dinossauro ou quando perdi o Gauss.

Agradeço à professora Dr.^a Maria Imaculada Muniz Junqueira, por abrir as portas do laboratório para mim e por sempre nos ensinar com um brilho nos olhos.

Agradeço aos meus amigos de caminhada, Danilo Corazza, Andreia Cascaes, André Cunha, Isabella Duarte e Luciana Leite. Obrigado por toda a ajuda que me deram nos experimentos ao longo desses anos e por todos os momentos que vivemos dentro e fora do laboratório. As noites viradas no citômetro foram muito mais divertidas com os funks que ouvimos e o tempo de incubação das células passou muito mais rápido com os cafés que tomamos. Obrigado também por me apoiarem e por sempre estarem

disponíveis, independente da situação. Agradeço ao Danilo por encher o laboratório com a sua alegria e por sempre aturar as minhas reclamações, ao André pelo seu grande companheirismo na hora de virar uma noite no laboratório (ou numa balada), a Andréia por tornar a pesquisa muito mais leve com o seu humor, a Isa por tentar me tornar uma pessoa saudável (tarefa difícil), e a Luciana, por sempre aparecer na hora que a gente precisa com aquele conselho que precisávamos ouvir. Agradeço também ao Arthur Fortuna, por me apoiar ao longo desses anos de mestrado, sempre me incentivando a seguir na carreira acadêmica, mesmo nos momentos que eu queria desistir.

Agradeço à Shirley Claudino e à Mariângela Souza por todos os momentos que passamos juntos no laboratório, por todo o conhecimento compartilhado e por todo apoio que me deram.

À minha amiga Luciana Fauber, que sempre está disponível para me ajudar com a correção gramatical dos meus trabalhos. Obrigado também pelos longos anos de amizade e por sempre me aguentar.

E agradeço a todos os amigos, familiares e professores que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Breve histórico e epidemiologia	2
1.2 Apresentação clínica	4
1.3 Vírus Zika, ciclo biológico e transmissão	6
1.4 Resposta imunológica e papel da micróglia na infecção pelo Zika	9
1.5 Zika e neuroinflamação	18
1.6 Autofagia	20
1.7 Curcumina	23
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	28
4. METODOLOGIA	30
4.1 Delineamento experimental	31
4.2 Linhagens celulares, vírus e estímulos inflamatórios utilizados	33
4.2.1 Vírus Zika	32
4.2.2 Células C6/36	32
4.2.3 Células Vero	33
4.2.4 Micróglias murinas BV2	33
4.3 Titulação do vírus Zika	34
4.4 Padronização das condições experimentais	36
4.4.1 Avaliação do efeito citotóxico da curcumina sobre as micróglias BV2 por ensaio de MTT	36
4.4.2 Avaliação do efeito citotóxico da curcumina sobre as micróglias BV2 por ensaio de apoptose/necrose	37
4.5 Procedimentos realizados com as micróglias BV2	39
4.5.1 Adesão e infecção das células BV2	39
4.5.2 Tratamento das células	40

4.5.3	Avaliação do efeito protetor da curcumina sobre as células BV2 durante a infecção pelo vírus Zika por MTT	40
4.5.4	Avaliação do efeito protetor da curcumina sobre as células BV2 durante a infecção pelo vírus Zika pelo teste de apoptose/necrose	41
4.5.5	Preparo das células para citometria de fluxo	42
4.5.6	Quantificação do vírus Zika e das proteínas caspase-3, LC3B e mTOR por citometria de fluxo	43
4.5.7	Quantificação das espécies reativas de nitrogênio	44
4.5.8	Quantificação das espécies reativas de oxigênio	45
4.5.9	Quantificação dos corpúsculos lipídicos pela sonda BODIPY	46
4.5.10	Quantificação das citocinas Th1/Th2/Th17	47
4.5.11	Estratégia de detecção por citometria de fluxo	48
4.6	Análise estatística	50
5.	RESULTADOS	52
6.	DISCUSSÃO	119
7.	CONCLUSÃO, LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	141
8.	REFERÊNCIAS	145
9.	ANEXO DE REAGENTES	176

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LOX	5 lipoxigenase
ATG	genes relacionados a autofagia
BSA	albumina fetal bovina
CCL	ligante de quimiocinas CC
CL	corpúsculo lipídico
COX-2	cicloxigenase 2
CXCL	ligante de quimiocinas CXC
DENV	vírus dengue
ER	retículo endoplasmático
ERNS	espécies reativas de nitrogênio
EROS	espécies reativas de oxigênio
Fas-L	Fas ligante
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IFN	interferon
IKK	quinase inibidora de quinase κ B
IL	interleucina
iNOS	sintase de óxido nítrico induzida
LPS	lipopolissacarídeos
MCP-1	proteína quimioatraente de monócitos 1
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
MOI	multiplicidade de infecção
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromídeo)
NF-κB	fator nuclear κ B
NK	células natural killers
NO	óxido nítrico
NOS	sintase de óxido nítrico
PBS	solução salina tamponada fosfatada

RNA	ácido ribonucleico
SNC	sistema nervoso central
STAT	transdutor de sinal e ativador de transcrição
TBK	quinase ligante de TANK
Th	T auxiliar
TLR	receptor Toll-Like
TNFR	receptor do fator de necrose tumoral
TNG	rede trans-Golgi
ULK	quinase ativadora da autofagia
ZIKV	vírus Zika

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	9
Ciclo de vida do vírus Zika.	
Figura 2	31
Fluxograma dos experimentos.	
Figura 3	34
Micróglias murinas hipocampais da linhagem BV2 com aumento de 40x.	
Figura 4	36
Placa de titulação em células Vero.	
Figura 5	49
Seleção da população de interesse no gráfico FSC por SSC	
Figura 6	49
Seleção das células positivas para a marcação	
Figura 7	50
Estratégia de detecção para a marcação com anexina/PI	
Figura 8	54
Influência do tratamento com diferentes concentrações da curcumina sobre a viabilidade das micróglias BV2 em cultura de 24h, avaliada pela redução do MTT.	
Figura 9	55
Influência da curcumina sobre a morte celular de micróglias BV2 em cultura de 24h.	
Figura 10	56
Efeito citopático do vírus Zika sobre a viabilidade das micróglias BV2 em cultura de 24h, avaliada pela redução do MTT.	
Figura 11	57
Influência da infecção pelo vírus Zika sobre a morte celular das micróglias BV2 em cultura de 24h.	
Figura 12	58
Efeito protetor da curcumina na concentração de 0,31 μ M sobre as micróglias BV2 na presença do vírus Zika em culturas de 24h, pelo teste de redução do MTT.	
Figura 13	59
Efeito protetor da curcumina na concentração de 0,62 μ M sobre as micróglias BV2 na presença do vírus Zika em culturas de 24h, pelo teste de redução do MTT.	
Figura 14	60
Efeito protetor da curcumina na concentração de 1,25 μ M sobre as micróglias BV2 na presença do vírus Zika em culturas de 24h, pelo teste de redução do MTT.	
Figura 15	61
Efeito protetor da curcumina na concentração de 2,5 μ M sobre as micróglias BV2 na presença do vírus Zika em culturas de 24h, pelo teste de redução do MTT.	
Figura 16	62
Efeito protetor da curcumina na concentração de 5 μ M sobre as micróglias BV2 na presença do vírus Zika em culturas de 24h, pelo teste de redução do MTT.	
Figura 17	63
Influência do tratamento com a curcumina sobre a morte por apoptose de micróglias BV2 infectadas o vírus Zika.	
Figura 18	64
Influência do tratamento com a curcumina sobre a morte por necrose de micróglias BV2 infectadas o vírus Zika.	
Figura 19	65
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na expressão da caspase-3 em cultivo de micróglias BV2 após 24h.	

Figura 20	67
Influência da curcumina na expressão da caspase-3 em cultivo de micróglias BV2 após 24h na presença do vírus Zika.	
Figura 21	68
Influência da curcumina na ativação da Caspase-3 em cultivo de micróglias BV2 após 24h na presença do vírus Zika.	
Figura 22	70
Influência da infecção pelo vírus Zika e do tratamento com a curcumina na expressão de LC3 em cultivo de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 23	71
Influência da curcumina na expressão de LC3 em cultivo de micróglias BV2 após 24h na presença do vírus Zika.	
Figura 24	72
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na expressão de mTOR em cultivo de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 25	74
Influência da curcumina na expressão de mTOR em cultivo de micróglias BV2 após 24h na presença do vírus Zika.	
Figura 26	75
Quantificação das micróglias BV2 infectadas pelo vírus Zika.	
Figura 27	76
Influência da curcumina sobre a quantidade de células infectadas pelo vírus Zika.	
Figura 28	78
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de EROs em cultivo de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 29	79
Influência da curcumina na produção de EROs em cultivo de micróglias BV2 após 24h na presença do vírus Zika.	
Figura 30	80
Influência da curcumina na produção de ERNs em cultivo de micróglias BV2 após 24h na presença do vírus Zika.	
Figura 31	81
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de EROs em cultivo de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 32	82
Influência da curcumina na concentração 0,31 μ M na produção de EROs em cultivos de micróglias BV2 na presença do vírus Zika após 24h.	
Figura 33	83
Influência da curcumina na produção de ERNs em cultivos de micróglias BV2 na presença do vírus Zika após 24h.	
Figura 34	85
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de corpúsculos lipídicos em cultivo de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 35	86
Influência da curcumina na produção de corpúsculos lipídicos em cultivo de micróglias BV2 na presença do vírus Zika após 24h.	
Figura 36	87
Representação da influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de corpúsculos lipídicos em cultivo de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 37	88
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IL-2 em cultivos de micróglias BV2 após 24h.	

Figura 38	90
Influência da curcumina na produção de IL-2 em cultivo de micróglias BV2 na presença do vírus Zika após 24h.	
Figura 39	91
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IL-4 em cultivos de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 40	93
Influência da curcumina na produção de IL-4 em cultivo de micróglias BV2 na presença do vírus Zika após 24h.	
Figura 41	94
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IL-6 em cultivos de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 42	96
Influência da curcumina na produção de IL-6 em cultivo de micróglias BV2 na presença do vírus Zika após 24h.	
Figura 43	97
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IL-10 em cultivos de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 44	99
Influência da curcumina na produção de IL-10 em cultivo de micróglias BV2 na presença do vírus Zika após 24h.	
Figura 45	100
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IL-12 em cultivos de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 46	101
Influência da curcumina na produção de IL-12 em cultivo de micróglias BV2 na presença do vírus Zika após 24h.	
Figura 47	102
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IL-17 em cultivos de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 48	104
Influência da curcumina na produção de IL-12=7 em cultivo de micróglias BV2 na presença do vírus Zika após 24h.	
Figura 49	105
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IFN- γ em cultivos de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 50	107
Influência da curcumina na produção de IFN- γ em cultivo de micróglias BV2 na presença do vírus Zika após 24h.	
Figura 51	108
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de MCP-1 em cultivos de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 52	110
Influência da curcumina na produção de MCP-1 em cultivo de micróglias BV2 na presença do vírus Zika após 24h.	
Figura 53	111
Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de TNF- α em cultivos de micróglias BV2 após 24h.	
Figura 54	113
Influência da curcumina na produção de TNF- α em cultivo de micróglias BV2 na presença do vírus Zika após 24h.	

RESUMO

O relato de numerosos casos de microcefalia no Brasil entre 2015 e 2016 alertou a comunidade científica mundial. O principal motivo foi a sua relação com os casos de infecção pelo vírus Zika. A organização mundial da saúde alertou para a necessidade do desenvolvimento de tratamentos para a infecção e prevenções ao desenvolvimento da microcefalia. Neste contexto, a curcumina tem se mostrado uma molécula de interesse para estudos com o vírus Zika, pois há na literatura evidências da sua ação sobre os flavivírus e já está demonstrada sua capacidade anti-inflamatória. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a curcumina tem a capacidade de interferir nos mecanismos de morte celular e de autofagia induzidos pelo vírus e se esta molécula possui ação imunomoduladora, importante na prevenção da neuroinflamação que ocorre durante a infecção. A melhor compreensão destes mecanismos poderá contribuir para o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas e diminuir a morbidade da infecção pelo vírus Zika. As micróglia murinas de linhagem BV2 foram infectadas com MOI 0,1 e MOI 1 do vírus Zika (cepa PE/243) e tratadas com 0,31 μ M, 0,62 μ M, 1,25 μ M, 2,5 μ M e 5 μ M de curcumina. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT e lida em espectrofotômetro. A expressão da caspase-3, da mTOR e da LC3 foram avaliadas por teste antígeno-anticorpo por citometria de fluxo. A morte celular foi avaliada pela marcação por anexina/iodeto de propídio, lido em citometria de fluxo. A produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio foram avaliadas pelas sondas DCF-DA e DAF-FM, respectivamente, em citometria de fluxo. A dosagem das citocinas foi realizada por kit CBA (BD), em citometria de fluxo. Os dados mostraram que o vírus Zika apresentou um efeito citopático sobre as células BV2 e a curcumina reverteu parcialmente esta citotoxicidade. Este efeito citopático do vírus foi resultado principalmente da indução da apoptose sem aumentar a produção de caspase-3 pelas micróglia. Já a curcumina, mesmo sem alterar o número de células apoptóticas, reduziu a sinalização pela caspase-3. Observamos também que o vírus Zika induz a autofagia nas micróglia sem alterar a expressão de mTOR, enquanto o tratamento com a curcumina induziu ainda mais a autofagia através da redução da expressão de mTOR. O

vírus Zika induziu uma resposta inflamatória pelas células BV2 com aumento da produção de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-17, MCP-1. Esta resposta inflamatória foi controlada pela curcumina, reduzindo a produção de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF- α nos grupos de células infectadas com MOI 0,1 do vírus e que receberam o tratamento de 2,5 μ M e 5 μ M. Por fim, observamos que a infecção aumentou a produção de EROs pelas células BV2. Apenas as células estimuladas com MOI 0,1 apresentaram a produção aumentada de ERNS. Em contrapartida, células na presença de MOI 1 produziram menos ERNs. Em conclusão, observou-se que o tratamento com a curcumina apresentou um efeito pró-oxidante durante a infecção pelo vírus Zika.

Palavras-chave: micróglia, Zika, curcumina, neuroinflamação, autofagia.

ABSTRACT

The report of numerous cases of microcephaly in Brazil between 2015 and 2016 have alerted the world scientific community. The main reason for it was the relation between cases of infection by Zika virus. The World Health Organization alerted the need of development of treatments for the microcephaly infection and prevention. On this context, curcumin has shown itself as an interesting molecule for studies with Zika virus because it has evidences of its action above flavivirus and anti-inflammatory capacity all over the literature. Therefore, the aim of the present work has been to analyze if curcumin interfered on cell death and autophagy pathways induced by the virus and if this molecule has immunomodulator action, which is important for the prevention of the neuroinflammation that happens during the infection. The best understanding of these pathways can contribute for the development of new therapeutic measures and decrease the morbidity of Zika virus infection. The BV2 cell line of murine microglia were infected by MOI 0,1 e MOI 1 of zika virus (strain PE/243) and treated with 0.31 μ M, 0.62 μ M, 1.25 μ M, 2.5 μ M and 5 μ M of curcumin. The cellular viability was evaluated by the test of MTT reduction and read in spectrophotometer. The expression of caspase-3, mTOR and LC3 has been evaluated by antigen-antibody test and read in flow cytometry. The cell death was evaluated by annexin/propidium iodide target and also read in flow cytometry. The production of reactive oxygen species and nitrogen was evaluated by DCF-DA and DAF-FM probes, respectively, in flow cytometry. The cytokine dosage has been done by CBA kit (BD) in flow cytometry. Our data has shown that zika virus presented a cytopathic effect in BV2 cells and curcumin has partly reversed this cytotoxicity. This cytopathic effect of the virus has happed mainly because of the induction of cell apoptosis, without increasing the production of caspase-3 by microglia. Curcumin, on the other hand, even without changing the number of apoptotic cells, has reduced the signaling by caspase-3. We also have observed that zika virus induced autophagy on microglia without changing mTOR expression, while the treatment with curcumin induced even more autophagy by the reduction of mTOR expression. Zika virus induced an inflammatory response by BV2 cells with an increase on IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL1-17, MCP-1 production. This

inflammatory response has been controlled by curcumin, decreasing IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ and TNF- α production on groups of cells infected by virus MOI 0,1 which received the treatment of 2,5 μ M and 5 μ M. In the end. We have observed that the infection increased EROs production by the BV2 cells. In addition, only cells stimulated by small amount of virus has shown increasing of ERNs production. On the other hand, cells infected by large amount of virus produced less ERNs. We have seen that the treatment with curcumin presented a pro-oxidant effect during zika virus infection.

Keywords: microglia, Zika, curcumin, neuroinflammation, autophagy.

INTRODUÇÃO

1.1. Breve histórico e epidemiologia

O relato de numerosos casos de microcefalia no Brasil entre 2015 e 2016 alertou a comunidade científica mundial e se tornou um grande desafio para o Sistema Único de Saúde brasileiro a curto e longo prazo. O principal motivo levantado na época, segundo a Organização Panamericana de Saúde (PAHO, 2016) foi a associação entre o aumento desses casos com a infecção causada pelo vírus Zika. Além dos casos de microcefalia, também foram reportados casos de Síndrome de Guillain-Barré associados às infecções pelo Zika. Segundo o Ministério da Saúde, houve um aumento no número de internações por síndrome de Guillain-Barré entre 2015 e 2016, coincidindo com o aumento no número de casos por Zika vírus (Hasan e cols, 2018).

Embora a infecção por Zika só tenha entrado em evidência no Brasil em 2015, o vírus já havia sido isolado pela primeira vez no soro de macacos *Rhesus* em 1947, quando um grupo de pesquisadores estudava a história natural da febre amarela na floresta de Zika, que fica próximo à Entebbe, na Uganda, no Leste Africano. Um ano depois da sua descoberta, o vírus foi identificado em mosquitos *Aedes africanus*, quando então recebeu a sua nomenclatura de Vírus Zika (Coelho e cols, 2017; Koppolu & Raju, 2018; Chang e cols, 2016).

No entanto, os primeiros casos de infecção pelo ZIKV em humanos foram reportados em 1952, na Uganda, e em 1954, na Nigéria. Estudos apontam que, nessa ocasião, cerca de 16,8% da população nigeriana possuía anticorpos neutralizantes para o Zika (Gutiérrez-Bugallo e cols, 2019). Este número subiu para cerca de 40% em 1970, mostrando a disseminação do vírus nesse país, que se espalhou por toda a África e pelo Sudoeste Asiático. Os primeiros casos fora do continente africano foram relatados entre 1977 e 1979, com 30 exames sorológicos positivos na Indonésia (Bell e cols, 1971; Coelho e cols, 2017; Wang e cols, 2016; Junior e cols, 2015). Porém, mesmo com a sua distribuição por estes continentes, até 2007 poucos casos esporádicos foram reportados (Koppolu & Raju, 2018).

O vírus Zika permaneceu relativamente desconhecido até 2007, quando ocorreu a primeira epidemia, nas ilhas Yap, na Micronésia, quando foram registrados cerca de 19 mil casos suspeitos e 284 casos confirmados da infecção. Nessa ocasião, não foram registradas mortes por ZIKV, nem comorbidades graves (Coelho e cols, 2017; Junior e cols, 2015).

A epidemia de ZIKV no continente americano iniciou em 2015. Os primeiros casos de infecção pelo vírus Zika nas Américas foram descritos no segundo semestre de 2015 no Rio Grande do Norte, no Nordeste brasileiro, e na Colômbia. No Brasil, provavelmente a vinda de estrangeiros para participar de eventos populares como o carnaval, contribuíram para a entrada do vírus no país. Neste momento, a população brasileira não apresentava imunidade contra o vírus; por isso, a infecção se espalhou rapidamente pela população, chegando a causar cerca de 1,5 milhões de casos confirmados em 2016. Do Brasil, a infecção se espalhou também por outros países da América do Sul, quando começou a ser associado ao desenvolvimento de microcefalia e de outras complicações neurológicas em recém-nascidos e em adultos (Koppolu & Raju, 2018; Villamil-Gómez e cols. 2016).

Nestes últimos anos, os casos de Zika diminuíram no Brasil. Em 2019, foram relatados 18.282 casos prováveis de infecção, com 3474 casos confirmados e relato de 55 casos de microcefalia causados pela infecção pelo ZIKV (Brasil, 2019; Brasil 2020). Já em 2020, o Ministério da Saúde relatou 6.705 casos prováveis de infecção pelo ZIKV, sendo que 49,7% destes casos estavam concentrados no Estado da Bahia (Brasil, 2020). Não foi descrito o número total de nascidos com microcefalia causada pela infecção no ano de 2020, mas dentre o total de pacientes suspeitos, 597 eram gestantes, destas, 186 tiveram a infecção pelo ZIKV confirmada (Brasil, 2019). Se comparado com 2017, quando foram registrados 17.025 casos suspeitos de infecção pelo vírus e 360 nascidos com microcefalia decorrente da infecção, esses dados revelam uma redução no número de casos. Entretanto, recentemente foi descrito uma nova variante do ZIKV circulante no Brasil, alertando a comunidade científica sobre a importância de manter a vigilância

epidemiológica e o desenvolvimento de tratamentos para a infecção (Brasil, 2018; Kasprzykowski e cols, 2020).

1.2. Apresentação Clínica

De maneira geral, cerca de 80% dos pacientes infectados pelo ZIKV são assintomáticos. Para os que apresentam manifestações clínicas, os sintomas são geralmente autolimitados. Febre baixa, erupções cutâneas, conjuntivite não-purulenta, artralgia, cefaleia e desordens digestivas são alguns dos sintomas apresentados durante a infecção. A clínica é semelhante às outras arboviroses, tal como ocorre na infecção pelo vírus Dengue e vírus Chikungunya, o que dificulta o diagnóstico (Koppolu & Raju, 2018; Wang e cols, 2016; Junior e cols, 2015; Shuaib e cols, 2016). Nos exames laboratoriais, alguns pacientes apresentam leucopenia, trombocitopenia, níveis elevados de lactato desidrogenase sérica e de gamma-glutamil transferase; além do aumento dos níveis de marcadores inflamatórios como proteína C reativa, fibrinogênio e ferritina (Tappe e cols, 2015; Chang e cols, 2016).

Até 2015, nenhuma morte ou outra complicação grave foi associada à infecção pelo ZIKV. Entretanto, em 2015 no Brasil, em associação ao aumento do número de casos de infecção pelo ZIKV, houve também o aumento do número de crianças nascidas com alterações neurológicas (Dupont-Rouzeyrol e cols, 2016; Petersen e cols, 2016). Segundo o Ministério da Saúde, a média de crianças nascidas com microcefalia anualmente era de 163 casos, sendo que este número subiu para cerca de 3935 casos entre 2015 e 2016 (Brasil 2015). Os estudos posteriores a essa observação demonstraram uma forte associação entre o aumento de casos de ZIKV com o aumento de nascimento de crianças com microcefalia (Morrey e cols, 2019; Hasan e cols, 2018). Foi observado que a infecção pelo ZIKV nos primeiros três meses de gravidez aumenta o risco de complicações neurológicas no feto, com um risco estimado

que varia de 1 a 19% (Petersen e cols, 2016; Wang e cols, 2016; Chang e cols, 2016; Koppolu & Raju, 2018).

Além da microcefalia, outras complicações neurológicas foram observadas nas crianças que entraram em contato com o vírus Zika no período intrauterino, mesmo para aquelas que apresentavam o perímetro cefálico normal. Algumas dessas alterações foram: ventriculomegalia, calcificações subcorticais, atraso no desenvolvimento motor, atraso no desenvolvimento cognitivo, perdas auditivas e alterações oculares. Além disso, algumas crianças apresentaram inquietação e convulsões dentro do período de 12 meses após o nascimento (Santos e cols, 2020; Mlakar e cols, 2016; Nem de Oliveira e cols, 2018). No estudo conduzido por Nielsen-Sines e colaboradores (2019), ao avaliarem o desenvolvimento de 146 crianças que foram expostas a ZIKV no período intrauterino e que nasceram com o perímetro cefálico normal, relataram que 34,9% destas crianças apresentavam dificuldade no desenvolvimento da fala, 16,4% apresentaram dificuldades no desenvolvimento motor, e 9,6% apresentaram dificuldade no desenvolvimento cognitivo (Nielsen-Saines e cols, 2019). Além disso, foi relatado que até 60% dos nascidos com o tamanho cortical normal apresentavam displasia cortical induzida pelo vírus Zika (Nem de Oliveira e cols, 2018).

Algumas complicações neurológicas também foram observadas em adultos infectados pelo vírus Zika. Dentre elas, a principal relatada foi a Síndrome de Guillain-Barré, uma neuropatia inflamatória que resulta em fraqueza nos membros, que costuma ter início 10 dias após o aparecimento dos sintomas da infecção viral (Morrey e cols, 2019; Malta e cols, 2017). Segundo o Ministério da Saúde, houve o aumento do número de internações por Síndrome de Guillain-Barré de 1455 para 1953, entre 2014 e 2015, e para 2208 no ano de 2016 (Brasil, 2020). Em alguns Estados do Nordeste brasileiro, como Pernambuco e Bahia, a epidemia de ZIKV foi responsável por aumentar em três vezes o número de internações por Síndrome de Guillain-

Barré. Além desta, outras desordens neurológicas também foram observadas em adultos, como encefalite, neurite óptica e mielite (Nóbrega e cols, 2018).

1.3. Vírus Zika, ciclo biológico e transmissão

O ZIKV é um vírus RNA de cadeia simples, com cerca de 11 mil pares de bases. Duas linhagens principais foram identificadas, de origem africana e de origem asiática (Wang e cols, 2016). O seu genoma é formado por duas regiões não-codificantes e por uma região codificante, que dá origem às proteínas estruturais (proteínas do capsídeo, envelope e membrana precursora) e as proteínas não-estruturais do grupo NS (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). A sua estrutura é similar à de outros flavivírus, com exceção do sítio de glicosilação ASN180 nas suas glicoproteínas, que é responsável pela sua forma icosaédrica (Koppolu & Raju, 2018; Chan e cols, 2016; Hasan e cols, 2018).

Por mais de 60 anos, a infecção pelo ZIKV foi apenas assintomática para a maioria dos pacientes e por esta razão, a doença não havia alertado anteriormente a comunidade científica para a necessidade de mais estudos. Consequentemente, pouco se sabe a respeito do ciclo biológico do vírus, quais células ele infecta e mecanismos de imunopatologia. Entretanto, sabe-se que o ciclo natural de transmissão das arboviroses, em geral, inclui a passagem por artrópodes, como a passagem pelos mosquitos (Chang e cols, 2016; Baud e cols, 2017; Wang e cols, 2016). No caso do ZIKV, a infecção humana se inicia principalmente por meio da picada da fêmea do mosquito *Aedes*. Entretanto, outras formas de transmissão também são de destaque, como a transmissão perinatal e transmissão sexual (Hasan e cols, 2018; Chang e cols, 2016; Patino-Barbosa e cols, 2015).

A transmissão dependente de vetor ocorre por meio da picada da fêmea do mosquito *Aedes*, quando essa realiza o repasto sanguíneo

necessário para a maturação dos ovos, momento em que o vírus é inoculado na pele humana. Sabe-se que o ZIKV infecta células da epiderme e derme humana, passando por um primeiro ciclo de replicação neste sítio. Dentre as células infectadas nestes tecidos, destacam-se os queratinócitos, fibroblastos e células dendríticas imaturas. Em fibroblastos, foi identificado rapidamente um aumento na quantidade de cópias do RNA viral, indicando a intensa replicação do vírus neste sítio de infecção inicial (Hasan e cols, 2018; Wang e cols, 2016). A média de vida de um mosquito fêmea é de 1 a 2 meses e cada mosquito consegue percorrer de 2 a 3 km durante o seu tempo de vida. O ZIKV consegue sobreviver no seu hospedeiro por um período médio de 2 meses, sugerindo ser estável no seu vetor (Besnard e cols, 2014; Musso *et al.* 2015; Patino-Barbosa e cols, 2015; Chang e cols, 2016).

Já os relatos de transmissão sexual são reforçados pela observação da presença do vírus no sêmen de homens infectados. Além disso, o ZIKV também foi identificado no leite materno de mulheres infectadas, porém ainda não há comprovação de que possa ocorrer a transmissão durante o aleitamento (Chang e cols, 2016). Em estudos experimentais com primatas, o RNA viral também foi detectado no sangue, sêmen, fluido vaginal, urina, saliva e líquido cefalorraquidiano dos animais infectados (Baud e cols, 2017).

Uma vez no hospedeiro, o vírion maduro entra nas células por endocitose, utilizando receptores como os receptores de células T, receptores de mucina e receptores de lectina do tipo C. Além desses, o ZIKV utiliza o receptor AXL para auxiliar sua entrada nas células (Figura 01). Este receptor é visto em grande quantidade em micróglia, células da placenta, fibroblastos e células do sistema imune, explicando, em parte, o tropismo do vírus por estas células (Koppolu & Raju, 2018). Essa ligação é feita pela glicoproteína E, presente no envelope viral, que ativa a via da endocitose. No lúmen do endossomo, a glicoproteína E sofre uma trimerização irreversível, devido a acidificação do meio, promovendo a fusão do endossomo com o envelope viral, permitindo a liberação do material genético do vírus no citoplasma

celular, onde é iniciada a sua replicação, seguida de montagem das partículas virais (Gratton e cols, 2019; Chan e cols, 2016).

Através das poliproteínas virais, o RNA viral é transportado e o grupo de proteínas NS é liberado no citoplasma da célula hospedeira. Nesse processo, o retículo endoplasmático (ER) e o complexo de Golgi são essenciais para a replicação viral. Primeiro, o ER dá origem às vesículas envolvidas no fluxo autofágico, um processo celular explorado pelos flavivírus para aumentar a própria replicação. No lúmen do retículo endoplasmático, as partículas virais imaturas são montadas, contendo as proteínas E, prM, membrana lipídica e capsídeo viral (Gratton e cols, 2019; Chan e cols, 2016).

Depois de montadas, o complexo de Golgi promove o tráfico de vírions através de rede trans-Golgi (TGN), transportando-os até a superfície da célula. Neste processo, ocorre a maturação das partículas virais, processo dependente de proteases e de modificações no pH, gerando um reposicionamento das glicoproteínas E, a clivagem das proteínas prM e a formação das proteínas M, que ficam ancoradas à membrana da partícula viral (Heinz & Stiasny, 2017). Neste momento, as partículas virais estão maduras e prontas para serem lançadas no meio extracelular e endocitadas por outras células. O genoma viral permanece empacotado com múltiplas cópias no capsídeo, derivado da membrana lipídica da célula hospedeira, envolto de aproximadamente 180 cópias das glicoproteínas do envelope (Hasan e cols, 2018; Gratton e cols, 2019; Chan e cols, 2016).

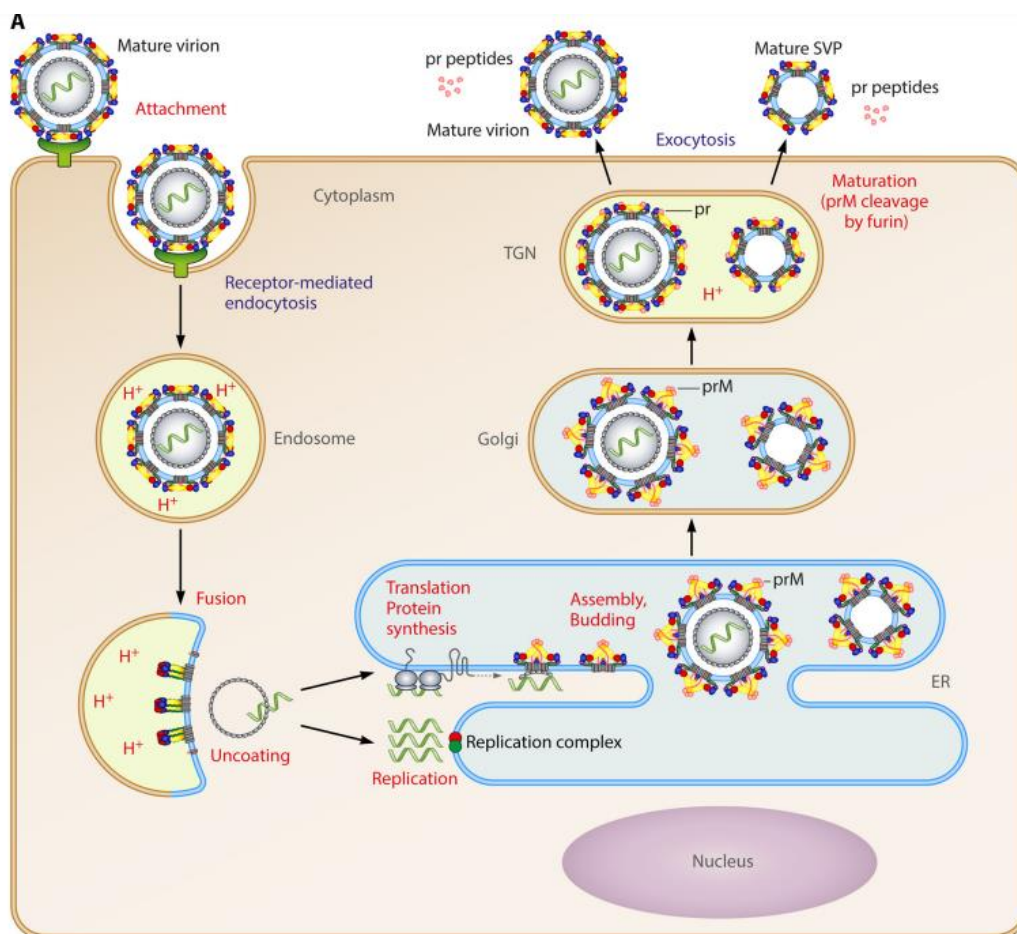


Figura 1: Ciclo de vida do vírus Zika. O vírus entra nas células quando se liga a receptores que induzem a endocitose e se funde com a membrana do endossomo por um mecanismo dependente de pH, lançando o RNA viral no citoplasma da célula hospedeira. A montagem da partícula viral imatura ocorre no retículo endoplasmático, formando uma partícula contendo as proteínas E, prM e membrana lipídica e capsídeo. Depois, no complexo de Golgi ocorre a maturação da partícula viral, com a clivagem da proteína prM nas proteínas pr e M. Por meio da rede trans-Golgi (TGN) a partícula viral chega a superfície da célula hospedeira, quando então a partícula viral é lançada no meio extracelular. Heinz & Stiasny, 2017.

1.4. Resposta imunológica e papel da micróglia na infecção por Zika

Para entender melhor a patologia causada pelo Zika, é importante abordar alguns aspectos da resposta imune aos vírus. Até o momento, não se sabe por completo quais os mecanismos imunológicos desencadeados durante a infecção pelo ZIKV (Glasner e cols, 2017). Entretanto, os vírus, de forma geral, ao entrarem nas células, estimulam tanto a resposta imune inata

quanto a resposta adaptativa. A resposta inata dependerá da capacidade de fagócitos e células natural killers (NK) de sensoriar as células infectadas pelos vírus ou identificar as partículas virais circulantes. Já a resposta adaptativa deverá desenvolver um perfil de resposta de células T auxiliar do tipo 1 (Th1) importante para ativação da resposta celular e humoral.

No contexto da resposta imune inata, as células NK possuem um papel crucial na proteção contra os vírus. Utilizando os receptores KIR e LIR, as células NK possuem a capacidade de reconhecer padrões moleculares expressos em células infectadas por vírus. Quando ativadas, as células NK respondem produzindo IFN- γ , uma citocina importante para a ativação de fagócitos e também produzem granzimas e perforinas, induzindo a apoptose da célula infectada (Rodrigues de Sousa e cols, 2021). Além de reconhecerem padrões que geram a sua ativação, as células NK também reconhecem moléculas que inibem a sua atividade, sendo o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe 1 a principal proteína reconhecida que inibe a atividade dessas células (Glasner e cols, 2017).

Entretanto, o vírus Zika possui a capacidade de escapar da resposta das células NK. Glasner e colaboradores (2017) observaram que células NK não são efetivamente ativadas quando estão em contato com outros tipos celulares infectados pelo ZIKV. Isso ocorre porque o vírus Zika não induz a expressão de padrões moleculares reconhecidos pelos receptores KIR e LIR. Além disso, o vírus aumenta a expressão de moléculas de MHC de classe I pelas células infectadas, reduzindo a ativação das células NK. Segundo esse trabalho, o aumento da expressão de moléculas de MHC ocorreu pelo estímulo das vias RIG-1 e RIF-3, mediados pelo IFN- β . Já segundo Lum e colaboradores (2018), a ativação das células NK durante a infecção pelo ZIKV é dependente da sinalização de monócitos e macrófagos. Nesse trabalho, as células NK na presença de monócitos circulantes apresentam maior produção de IFN- γ e CD107a, dois marcadores que indicam a atividade dessas células. A comunicação entre monócitos e células NK ocorreu principalmente através

das quimiocinas CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL5 e MCP-1, além das citocinas IL-1 β e IL-15.

Além de estimular a atividade das células NK, os monócitos e macrófagos possuem um importante papel no reconhecimento inicial do ZIKV. O reconhecimento se dá principalmente pelos receptores TLR3 e TLR7, induzindo os genes de estimulação dos interferons (ISG), resultando geralmente na polarização dos macrófagos no fenótipo M1, com aumento da produção de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- α , IFN- β e IFN- γ , além de MCP-1 e iNOS (Rodrigues de Sousa e cols, 2021).

Entretanto, este padrão de produção de citocinas pelos macrófagos residentes no SNC está relacionado com a neuroinflamação. Essa subpopulação de macrófagos, chamadas de micróglias, são residentes das regiões perivasculares do SNC. Presentes na túnica adventícia de artérias, arteríolas, veias e vênulas, sendo então responsáveis por monitorar o microambiente e manter a homeostase através dos seus mecanismos de defesa, que se diferem da na resposta dos macrófagos perivasculares e teciduais. Isso se deve ao fato de as micróglias estarem presentes em um microambiente diferenciado, com capacidade limitada de reparo tecidual e com dificuldade de tolerar processos inflamatórios intensos, necessitando de um rigoroso controle das respostas imunes (Hanisch, 2002; Mosser e cols, 2017). Como estão em contato direto com as células neuronais, seus mecanismos imunológicos afetam o funcionamento natural dos neurônios, interferindo na sua capacidade sináptica e capacidade de sobrevivência (Hanisch, 2002; Mosser e cols, 2017).

Nos estágios iniciais das doenças, as micróglias são rapidamente mobilizadas e ativadas por envelopes virais, componentes bacterianos ou outros antígenos. Essa ativação resulta em alterações no seu fenótipo e morfologia, adquirindo um aspecto ameboide e expressando genes relacionados a sua capacidade de movimentação, proliferação e capacidade fagocitária (Mosser e cols, 2017).

O sistema de Interferons (INF) faz parte dos primeiros mecanismos de defesa ativados pelo sistema imune na resposta antiviral. Esse sistema é formado pelos interferons do tipo I (α e β), tipo II (γ) e interferon do tipo III (λ). Quase todas as células nucleadas conseguem produzir e responder ao IFN do tipo I, quando o vírus é reconhecido por receptores de padrões moleculares, como o RIG-1 ou o MDA5. Esses receptores são citosólicos e induzem a ativação e transcrição de fatores intracelulares, promovendo a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias para estímulo de respostas imunes inata e adaptativas (Ngono & Shresta, 2018).

Quando os receptores RIG-1 ou o MDA5 são ativados, ocorre o recrutamento da proteína adaptadora de sinalização antiviral (MAVS) para a ativação da via não-canônica das quinases IKK ϵ e TBK1, ambos ativados pela via do NF- κ B, para induzir a produção de mais IFN-I. A sinalização intracelular do IFN é através da ativação da JAK-STAT, que fosforilam e ativam a via da STAT-1 e STAT-2 (Ngono & Shresta, 2018). Entretanto, nas células humanas, o ZIKV tem a capacidade de antagonizar a resposta do Interferon do tipo 1, por meio da degradação proteassomal da STAT-2. Essa mesma ação não é vista em camundongos, explicando, em parte, o porquê dos camundongos não serem hospedeiros naturais para o ZIKV (Miner & Diamond, 2017).

As micróglia possuem a capacidade de produzir o IFN- γ quando estimuladas pela IL-12 ou pela IL-18. É uma citocina essencial para a indução da resposta Th1, aumentando a expressão de moléculas de MHC de classe I e II, e moléculas de adesão, facilitando a apresentação de antígenos (Hanisch, 2002; Peters, 1996). Em micróglia, o IFN- γ aumenta a expressão de ICAM-1, moléculas acessórias B7, receptores de LPS, Fc γ e receptores de complemento. Entretanto, o aumento exacerbado de IFN- γ pode induzir a apoptose através da expressão simultânea do Fas e Fas-L (Koppolu & Raju, 2018). As micróglia, quando estimuladas pelo IFN- γ junto com a IL-12 ou IL-18, possuem a capacidade também de produzir IL-2, uma citocina conhecida como fator de crescimento de linfócitos T. Mesmo com uma produção em níveis baixos, vários estudos reportaram a capacidade das micróglia em

produzir esta citocina, além de expressarem todos os receptores que a reconhecem. O aumento da IL-2 e do IFN- γ , juntos, estimulam as micróglias a aumentarem a produção de óxido nítrico (NO), uma molécula vasoativa e com atividades microbidas (Chaturvedi & Nagar, 2009; Hanisch, 2002).

Um sinal inflamatório e imunoestimulador crucial para a ativação das micróglias é a IL-1 β . Ela, junto com a IL-6 e o TNF- α , está envolvida com a capacidade proliferativa e funções celulares durante o desenvolvimento do SNC, modulando a eficácia das sinapses, especialmente no hipocampo, local rico em IL-1R, alterando os perfis de sono e fome e induzindo a febre e sensação de dor. Por outro lado, a IL-1 β pode estar presente em diversas doenças neuroinflamatórias como a síndrome de Guillain-Barré (Hanisch, 2002; Kraychete e cols, 2006; Gulati e cols, 2016).

O TNF faz parte da imunidade contra os vírus (Pitha, 2011; Muniz-Junqueira e cols, 2001), mas também pode ser responsável pela imunopatogenia (Wait e cols, 2011). A produção do TNF é induzida pela ativação da via do NF- κ B durante o reconhecimento de antígenos virais ou em função da ligação de citocinas pro-inflamatórias à receptores extracelulares. Uma vez secretado, o TNF se liga aos seus receptores TNFR1 ou TNFR2 que retroalimentam a via de ativação do NF- κ B (Idriss & Naismith, 2000). Tem sido mostrado que para escapar das defesas do hospedeiro, os vírus podem subverter a via do NF- κ B, como observado em estudo com os Poxvirus, vírus Zika e da Dengue (Mohamed e McFadden, 2009; Serman e Gack, 2019; Beaver e cols, 2018). No caso do vírus Zika, a subversão da via do NF- κ B se dá pelo complexo proteico NS2b3, uma protease viral com capacidade de clivar o receptor cGAS. Este é um receptor que, quando ativado, induz o aumento da atividade do IKK, resultando na translocação das proteínas do NF- κ B. Com o receptor cGAS bloqueado, esta sinalização fica prejudicada e o vírus consegue escapar da resposta do hospedeiro (Serman e Gack, 2019).

No tecido cerebral, o TNF pode ser produzido por neurônios, astrócitos e micróglias. Níveis elevados de TNF são observados principalmente em

isquemias e injúrias, infecções bacterianas e virais e na esclerose múltipla. Possui efeito tóxico direto sobre estruturas neuronais, como a mielina (Hanisch, 2002).

O NF- κ B é um conjunto de pequenas proteínas intimamente relacionadas que se ligam a um motivo comum conhecido como sítio κ B. Essa família de receptores é composta pelas proteínas RelA, RelB, c-Rel, p105/p50 e p105/p52, que se encontraram dimerizadas no citoplasma e ligadas ao I κ B (Siebenlist, 1997). Na ausência de estímulos, o I κ B mantém-se ligado ao NF- κ B, impedindo a translocação do dímero para o núcleo. Após o estímulo, o I κ B é fosforilado e os dímeros liberados para translocar para o núcleo, onde se ligam o DNA e exercem a função de promotor gênico, responsáveis pela expressão de genes relacionados com a apoptose, adesão celular, proliferação, respostas imunológicas inatas e adaptativas, resposta oxidativa e remodelamento tecidual (Baldwin 1996; Perkins, 2007).

Além de estarem envolvidas com o controle da expressão de citocinas, estudos demonstraram que a via do NF- κ B também está envolvida com o controle da produção de outros mediadores inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, prostaglandinas e leucotrienos. Também pode estimular o aumento da expressão de proteínas antioxidantes, como a superóxido dismutase, podendo variar de acordo com a via do NF- κ B que foi ativada (Morgan & Liu, 2010).

O NO é um sinalizador autócrino e parácrino, produzido por uma grande variedade de células, como macrófagos, células endoteliais, células de Kupffer, células adrenais e células do tecido cerebral. Possui atividades vasoativas, por exemplo, no controle da vasodilatação e estímulo da agregação plaquetária, e funções imunitárias, como no combate às infecções e tumores e ativação de macrófagos citotóxicos. Ele é um produto da oxirredução da L-arginina pela atividade enzimática da óxido nítrico sintase (NOS). No sistema nervoso central, o NO é produzido em níveis basais pela nNOS (NOS neuronal), uma isoforma da enzima NOS, importante para o controle da neurotransmissão. Esta produção é aumentada quando as

micróglia são induzidas por sinais inflamatórios, como o IFN- γ , aumentando a expressão de iNOS (NOS indutível), a isoforma induzida durante a resposta imunológica (Chaturvedi & Nagar, 2009).

Durante as infecções virais, o óxido nítrico age como a uma importante molécula que inibe a replicação viral. Entretanto, a sua produção exacerbada causa danos teciduais ao hospedeiro. Primeiro, o aumento da produção de NO ocorre por meio do reconhecimento das proteínas virais pelos receptores de padrões do hospedeiro, como os receptores TLR3, TLR7, RIG-1 e MDA5. Esses receptores, quando reconhecem as proteínas virais, ativam os fatores de transcrição 1 e 2 (STAT-1 e STAT-2), que por sua vez estimulam a expressão dos genes regulados pelo INF, aumentando assim a expressão de citocinas inflamatórias IFN- γ , a IL-1 β e o TNF- α e da enzima iNOS. Por sua vez, essas citocinas ativam a via do NF- κ B e STAT-1, aumentando ainda mais a expressão da enzima iNOS pelos fagócitos (Serman & Gack, 2019; Chaturvedi & Nagar, 2009; Bronte & Zanovello, 2005). Já as citocinas com atividades imunomoduladoras, como a IL-10 e IL-4, inibem a expressão da iNOS, diminuindo a produção de NO (Bronte & Zanovello, 2005).

O NO pode inibir a replicação viral de uma grande gama de vírus, principalmente por meio da S-nitrosilação irreversível das proteínas virais e por meio da formação do peroxinitrito, que inibe a entrada de vírus nas células do hospedeiro por meio da oxidação das proteínas do capsídeo viral (Chaturvedi & Nagar, 2009; Padalko e cols, 2004). Esse mecanismo já foi descrito nas infecções com flavivírus. Na dengue, estudos em modelos experimentais mostram que os medicamentos doadores de NO inibem a replicação viral, resultando na menor síntese das proteínas virais, assim agindo como uma molécula de defesa (Chaturvedi & Nagar, 2009; Ubol e cols, 2008). Isso também foi visto por Charmsilpa e colaboradores (2005) que demonstraram que a inibição da replicação do DENV foi dependente da dose de doadores de óxido nítrico usados, mostrando a importância desta molécula para a imunidade antiviral.

Um importante local de produção de mediadores inflamatórios são os corpúsculos lipídicos (Wymann & Schneider, 2008; Wan e cols, 2007). Estes

corpúsculos são organelas citoplasmáticas que estão presentes praticamente em todas as células de mamíferos. Em leucócitos e células endoteliais sua quantidade aumenta rapidamente quando essas são induzidas por antígenos ou em resposta à presença de citocinas no meio ambiente como IL-6 e IFN do tipo 1 (den Brock e cols, 2018; Bozza e cols, 2011; Bozza & Melo, 2005). Os corpúsculos lipídicos estruturalmente são ricos em lipídeos neutros, considerado um sítio hidrofóbico, contendo uma grande quantidade de lipídeos naturais em seu interior, delimitados por uma monocamada fosfolipídica, podendo variar em número, tamanho e composição (Bozza & Melo, 2005; Wymann & Schneiter, 2008). São organelas que apresentam no seu interior predomínio de enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, como a COX-2 e 5-LOX, mas também podem ser encontradas citocinas, como TNF- α e IL-6 (Bozza e cols, 2009) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Bozza e cols, 2011; Ye e cols, 2020). Realizam importante interação com os fagossomos, sendo essenciais para a sua maturação e degradação dos patógenos fagocitados, lançando o seu conteúdo dentro dos fagossomos (Melo & Dvorak, 2012).

Na resposta adaptativa, a presença de uma resposta de células auxiliares do tipo 1 (Th1) toma um papel crucial no controle e/ou erradicação dos vírus. Neste tipo de resposta, os linfócitos T CD4 reconhecem as proteínas estruturais do vírus apresentados pelos fagócitos após a fagocitose de células infectadas ou células em apoptose infectadas por vírus e os linfócitos T CD8 irão reconhecer as proteínas não-estruturais do vírus apresentadas nas moléculas de MHC (Machado e cols, 2004). Em conjunto, essas células apresentam uma resposta com produção de IFN- γ e TNF- α , citocinas importantes para o controle da replicação viral, além das células CD8 produzirem CD107a e granzima B, duas moléculas citotóxicas que induzem a morte de células infectadas. (Andrade & Harris, 2018; Tonnerre e cols, 2020).

Contudo, pouco se descreve sobre como antígenos provenientes do Zika podem induzir essa resposta. De maneira geral, no sistema nervoso central, a micróglia irá desempenhar a função de apresentação do vírus Zika

aos linfócitos T efetores que ali chegarem. As micróglia, após o reconhecimento do Zika por meio dos receptores intracelulares ou após o reconhecimento no meio extracelular o vírus livre, ocorre a produção de IL-12, importante citocina ativadora de linfócitos. Concomitantemente e na presença de interferon produzida pelos linfócitos após o reconhecimento dos antígenos virais, as micróglia expressam grande quantidade de MHC de classe 2 e B7 necessários, respectivamente, para a apresentação de antígenos e como segundo sinal de ativação dos linfócitos T (Hanisch 2002). O reconhecimento de antígenos virais, neste ambiente com IL-12 estimula a mudança do perfil das células T para a produção de citocinas do padrão T auxiliar 1 (Th1), entre elas IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Mosser e cols, 2017; Hanisch 2002).

Esse perfil de produção de citocinas foi visto por da Silva e colaboradores (2019) em pacientes infectados com o vírus Zika. Neste trabalho, observaram que o aumento da produção de IFN- γ e TNF- α está relacionado com a fase aguda da infecção pelo ZIKV, enquanto as citocinas do ramo Th2, como IL-10 e IL-13, estão aumentadas no período de convalescência dos pacientes. De forma semelhante, Tonnerre e colaboradores (2020) observaram em gestantes infectadas pelo ZIKV um aumento de linfócitos TCD4 circulantes na fase aguda da doença. Em sua maioria, estas células eram reativas para as proteínas estruturais do ZIKV e eram produtoras de TNF- α , IFN- γ e IL-2.

A presença de um padrão Th1 de resposta estimula em linfócitos B a produção de anticorpos neutralizantes, que são eficazes no bloqueio da entrada dos vírus nas células. Segundo Tonnerre e colaboradores (2020), gestantes infectadas com o ZIKV possuem a melhora dos sinais clínicos da infecção quando estão no momento de maior produção de IgG neutralizantes.

Uma vez que a infecção viral tenha sido controlada e/ou tenha ocorrido o clearance dos vírus dos tecidos e da circulação, a resposta Th1 deve ser amplamente regulada. Neste momento citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β possuem a capacidade de suprimir a resposta imunológica. Estas citocinas

inibem a produção de outros mediadores inflamatórios pelas micróglias, como a IL-1 β e TNF- α e suprimem a ativação dos segundos mensageiros ativados pelas citocinas pró-inflamatórias. A IL-4 também possui a capacidade de induzir a síntese de IL-1ra, um antagonista dos receptores de IL-1 β (Hanisch, 2002; Peters, 1996). Vários vírus possuem a capacidade de mimetizar a IL-10, para imunossuprimir a resposta inflamatória (Peters, 1996). Contudo, na infecção por Zika pouco foi descrito sobre o papel dos padrões de resposta imune e das ações das citocinas tanto na imunidade quanto na imunopatologia (Maucourant e cols, 2019).

1.5. Zika e Neuroinflamação

Uma notável característica do ZIKV que o difere de outros flavivírus é o seu tropismo pelas células neuronais. Essa característica foi demonstrada por diversos estudos com cultivos celulares, modelos experimentais e em humanos (Baud e cols, 2017; Olmo e cols, 2017), onde é observado que a infecção por este vírus reduz a viabilidade celular de neurônios e de seus precursores, diminuindo o ciclo de replicação destas células, aumentando a apoptose e gerando desregulação na sua proliferação (Koppolu & Raju, 2018).

Uma justificativa para este tropismo é a grande presença do receptor AXL que o vírus Zika pode utilizar para entrar nestas células. O receptor AXL também é visto em grande quantidade em micróglias, células da placenta, retina, fibroblastos e células do sistema imune (Koppolu & Raju, 2018). Isso foi confirmado pelo estudo desenvolvido por Chan e colaboradores (2016), no qual 18 linhagens celulares diferentes foram expostas ao ZIKV e o crescimento do vírus foi avaliado por um período de 5 dias. Entre os resultados, eles observaram que o vírus foi capaz de infectar e se replicar nas células neuronais de forma mais acentuada do que em células de outros tecidos, como as do trato gastrointestinal e trato urinário. Houve também um pequeno crescimento viral em cultivos de monócitos humanos. Além disso,

eles observaram que células de camundongo, como a linhagem de micróglias BV2, foram permissivas para a infecção, porém, o vírus apresentou uma baixa replicação (Chan e cols, 2016). Já Papa e colaboradores (2017) viram que as cepas africana e brasileira eram capazes de infectar células endoteliais do cérebro de camundongo e induzir a morte destas células. Segundo os autores, cerca de 70% das células permaneceram vivas após 96 horas na presença do vírus, indicando um efeito citopático. Além disso, o vírus induziu a produção de IL-6 e CCL5, sugerindo a sua capacidade de atrair leucócitos, principalmente linfócitos para a barreira hematoencefálica.

Outros estudos demonstraram que o ZIKV é capaz de atravessar a barreira placentária e infectar o sistema nervoso dos fetos em desenvolvimento, através de mecanismos que ainda não estão bem elucidados. Isso foi observado pela primeira vez na Polinésia Francesa, em 2013, com a detecção do RNA viral no líquido amniótico de gestantes com os sintomas da infecção com o ZIKV (Koppolu & Raju, 2018). Depois disso, vários estudos histopatológicos também relataram a presença do vírus no tecido cerebral de fetos (Duarte e cols, 2017; Koppolu & Raju, 2018), mostrando o seu forte tropismo pelas células progenitoras neuronais no córtex, induzindo a morte dessas células por apoptose (Baud e cols, 2017). Isso foi confirmado através de microscopia eletrônica em células neuronais de fetos com microcefalia, sugerindo a infecção viral transplacentária e dando embasamento para a hipótese de que a microcefalia e outras anormalidades neurológicas, como ventriculomegalia, calcificação cerebral difuso, atrofia cerebral e desordens relacionadas com desestabilidades motoras, estão todas relacionadas com a infecção aguda pelo ZIKV (Wang e cols, 2016; Baud e cols, 2017). Este fenômeno também foi observado em modelos experimentais. Em camundongos, foi visto a presença do ZIKV em tecidos fetais após a infecção da progenitora, sugerindo a transmissão vertical. Os fetos de camundongos infectados apresentaram anormalidade semelhantes às observadas em humanos (Baud e cols, 2017) e os camundongos adultos infectados apresentaram morte dos neurônios por apoptose (Li e cols, 2016).

As evidências indicam que a infecção pelo ZIKV induz uma resposta antiviral, caracterizada pelo aumento de IFN- α , IL-1 β , IL-6, TNF- α e MCP-1. A presença do vírus induz a ativação das micróglia, fenômeno observado tanto *in vitro*, quanto em cortes histológicos. Esta ativação resulta em neuroinflamação local, com morte dos neurônios e redução do desenvolvimento celular, principalmente no córtex (Lum e cols, 2017). Olmo e colaboradores (2017) observaram que células neuronais infectadas apresentam maior produção e liberação de TNF- α , IL-1 β e glutamato, mediadores que induzem a excitotoxicidade de neurônios através do aumento intracelular de Ca²⁺. Segundo os autores, a morte dos neurônios ocorreu principalmente entre 12 e 24 horas de infecção, coincidindo também com o período que o tecido apresentava a maior concentração de TNF- α , IL-1 β e glutamato. Eles observaram que o número de células com o aumento da atividade da caspase-3 foi muito superior ao número de células infectadas com o ZIKV. Isso foi confirmado pelo trabalho desenvolvido por Wang e colaboradores (2018), onde células progenitoras neuronais expostas ao sobrenadante de micróglia infectadas pelo ZIKV apresentaram redução da proliferação e diferenciação celular. Todos esses achados, em conjunto, indicam que a morte dos neurônios não é decorrente apenas da replicação viral, mas que pode ser ativada através da comunicação celular e pelo aumento dos mediadores inflamatórios, mostrando a importância de estudar novos medicamentos que controlem a ativação do sistema imune como forma de controlar os danos neurológicos.

1.6. Autofagia

Um campo interessante e que vem sendo cada vez mais estudado diz respeito ao papel da autofagia principalmente nos fagócitos como um mecanismo importante para clarificar as infecções intracelulares (Nicola *et al.* 2012). A autofagia em si é um mecanismo essencial que pertence ao sistema

lisossomal e é utilizada para degradação de macromoléculas danificadas, proteínas redundantes ou de organelas envelhecidas, como peroxissomos, mitocôndrias e retículos endoplasmáticos (Gratton e cols, 2019; Mizushima e cols, 2008; Rocchi & He 2015).

Três formas diferentes de autofagia foram identificadas: a microautofagia, autofagia mediada por chaperonas e a macroautofagia, também chamada apenas de autofagia. Cada um desses processos apresenta funções fisiológicas específicas, sendo a macroautofagia a mais bem conhecida e caracterizada (Gratton e cols, 2019). A microautofagia é caracterizada pela degradação de componentes intracelulares diretamente pela incorporação desses componentes ao lisossomo. Já a autofagia por chaperonas ocorre quando o material citoplasmático a ser degradado é primeiro conjugado a uma chaperona, que permite a sua translocação para o lisossomo. Por fim a macroautofagia é um processo mais complexo que envolve a formação de um compartimento intracelular chamado de fagóforo, que posteriormente se funde aos lisossomos, degradando o seu conteúdo (Deretic & Levine, 2018; Perrone e cols, 2019; Gratton e cols, 2019; Orvedahl & Levine, 2008).

Virtualmente, este processo ocorre em todas as células eucarióticas em níveis basais, podendo ser rapidamente regulado de forma positiva em respostas aos sinais de estresse ou privação de nutrientes para geração de energia intracelular e manutenção da homeostasia (Gratton e cols, 2019). Esses sinais podem ser citocinas como a IL-1 β , espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a presença de antígenos virais, como é observado na infecção pelo vírus dengue, onde as proteínas NS4A e NS4B induzem a autofagia. Como sinais que inibem a autofagia, temos como principal a proteína mTOR, uma proteína que permanece ativada por fatores de crescimento e nutrientes intracelulares. Na ausência dos fatores de crescimento ou nutrientes, a mTOR é inibida, dando início ao processo autofágico (Deretic & Levine, 2018; Perrone e cols, 2019).

Tanto a indução quanto o controle da autofagia são processos complexos que envolvem a interação de várias proteínas. Ela é iniciada durante a formação de uma vesícula de membrana única chamada de fagóforo, que se alonga para envolver o material a ser reciclado, fechando em si mesma em um processo chamado de nucleação (Tanida *et al.* 2004; He & Klionsky, 2009).

A iniciação é coordenada pelas proteínas ULK1 e ULK2. Essas proteínas são constantemente inibidas pela mTOR, até que haja a presença de algum sinal indutor da autofagia. Já o alongamento é mediado por dois sistemas de conjugação do tipo ubiquitinas, que juntos montam um complexo de proteínas ATGs, que têm por função processar a proteína LC3, inicialmente na sua forma solúvel (LC3-I), conjugando-a à fosfatidiletanolamina, gerando a sua forma ativa (LC3-II). A LC3-II, por sua vez, se liga aos fosfolípidios da membrana do fagóforo, possibilitando assim, a sua extensão, curvatura e fechamento (Tanida *et al.* 2004; He & Klionsky, 2009; Gratton e cols, 2019). Por fim, a nucleação depende da formação de uma plataforma proteica central, na qual a proteína Beclin-1 desempenha um papel de destaque no final desse processo para formação de uma vesícula com bicamada lipídica de tamanho entre 300 e 900 nm chamada de autofagossomo. Uma vez formada, o autofagossomo sofre maturação após receber influxo de produtos da via endocítica e assim adquire capacidade degradativa e de acidificação. Estes vacúolos ácidos e hidrolíticos formam um compartimento de membrana simples chamada de anfissomo (Yang & Klionsky 2010). O último estágio da autofagia é a fusão dos anfissomos com os lisossomos para degradação dos componentes dentro da vesícula e reciclagem de nutrientes e membranas, contribuindo assim para suprir as necessidades metabólicas e a manutenção de uma função lisossomal contínua (Silva & Jung, 2013).

A autofagia também tem sido estudada na resposta imunitária contra os vírus (Dreux & Chisari, 2010). Nas infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), reporta-se um aumento da autofagia nas células mononucleares periféricas de indivíduos controladores que são reconhecidos

por manter a viremia baixa ao longo de anos, possivelmente porque durante o mecanismo de autofagia, a proteína TAT do HIV é degradada (Nardacci *et al.* 2014; Sagnier *et al.* 2015). Por ser fundamental nas respostas contra vírus, o processo de autofagia é inclusive alvo do controle viral, como por exemplo, a proteína ICP34.5 do vírus Herpes simplex é capaz de inibir a Beclin-1, proteína chave no mecanismo (Orvedahl *et al.* 2007); o vírus da dengue promove a degradação proteossômica do receptor p62 importante na maturação do autofagossoma (Metz & cols., 2015); enquanto a proteína Vif do HIV inibe a formação do autofagossoma (Borel e cols, 2015).

Vários estudos indicam que o mecanismo da autofagia também pode ser largamente utilizado por vírus durante a replicação (Zhang *et al.* 2014; Lai *et al.* 2016). Tanto o vírus da Dengue quanto o da Chikungunya manipulam o processo da autofagia para potencializar suas replicações (Carneiro & Travassos, 2016). No caso da Dengue, o vírus induz uma degradação de lipídeos dependente de autofagia, mobilizando os triglicerídeos para produzir ATP, através da beta oxidação (Lee e cols, 2008; Heaton & Randall 2010). Já o vírus Chikungunya induz o retículo endoplasmático e o estresse oxidativo, para então estimular a autofagia e reduzir a apoptose, levando a célula a maior sobrevivência (Krejlich-Trotot e cols, 2011; Joubert *et al.* 2012). Possivelmente, o vírus Zika utilize o mesmo mecanismo, uma vez que se observou a presença de seus capsídeos virais em autofagossomos (Hamel *et al.* 2015; Carneiro & Travassos, 2016). O conhecimento sobre a relação do vírus Zika com a autofagia ainda é muito inicial, mas possivelmente a intervenção neste mecanismo possa responder por alterações nas funções celulares e morte celular.

1.7. Curcumina

A curcumina (C₂₁H₂₀O₆) é uma molécula encontrada principalmente no rizoma da *Curcuma longa*, de outras espécies de *Curcuma* spp. e de

alimentos apimentados. Vulgarmente conhecida como Açafrão-da-terra, ela é um ingrediente comum na dieta de países asiáticos, principalmente na Índia e na Tailândia, onde é usada como corante e tempero (Nabila e cols, 2020; Schneider e cols, 2015; Sharma e cols, 2007; Larisat e cols, 2018). Além disso, a curcumina é usada há séculos na medicina tradicional para doenças inflamatórias como por exemplo no tratamento da artrite (Prasad e cols, 2014). Ela faz parte do grupo dos curcuminoides, moléculas bioativas presentes na Curcuma, composto pela curcumina, demetoxicurcumina (DMC) e bisdemetoxicurcumina (BDMC) (Kotha & Luthria, 2019).

Foi extraída pela primeira vez em 1815 e isolada em 1842, mas as suas propriedades medicinais foram descritas na literatura científica apenas em 1949, quando registraram a sua atividade bactericida (Prasad e cols, 2014; Kotha & Luthria, 2019). Depois, foi descrita a sua capacidade de controle do colesterol em 1971, de controle da glicemia em 1972, atividade anti-inflamatória em 1973 e antioxidante em 1976. Em 1995, pesquisadores observaram que a atividade anti-inflamatória da curcumina era decorrente da inibição da via no NF- κ B, diminuindo, por consequência, a produção de citocinas inflamatórias como o TNF- α , MCP-1 e IL-6 (Prasad e cols, 2014; Sharma e cols, 2007).

A curcumina é uma molécula praticamente insolúvel em água em meios ácidos e neutros, mas possui uma boa solubilidade em etanol e em DMSO (Prasad e cols, 2014; Kotha & Luthria, 2019). Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a curcumina apresenta baixa estabilidade, consequência principalmente da alta capacidade de doar hidrogênio, característica essencial para a sua atividade antioxidante e quelante de metais (Kotha & Luthria, 2019). Recentemente, vários estudos têm mostrado a ação terapêutica da curcumina, com ação sobre diversos sistemas, como sistema nervoso central e periférico, cardiovascular, digestivo, respiratório e endócrino (Mirzaei e cols, 2016; Patel e cols, 2020; Schneider e cols, 2015). Além disso, a curcumina interage com diversas moléculas envolvidas na resposta imunológica, como IL-1 β , IL-6, IL-

8, IL-12 e TNF- α (Sharma e cols, 2007; Patel e cols, 2020; Cheng e cols, 2019).

Há também vários registros da ação antiviral da curcumina, principalmente sobre vírus envelopados, como os flavivírus (Nabila e cols, 2020). É proposto que a curcumina interaja com o sistema proteassoma-ubiquitina (USP), um sistema importante para a replicação de flavivírus, além de inibir as proteínas NS2B e NS3 do DENV-2 (Nabila e cols, 2020; Balasubramania e cols, 2019). Foi visto por Padilla-S e colaboradores (2013) que concentrações de 11,51 μM de curcumina tem a capacidade de inibir em 50% a replicação do vírus dengue do tipo 2. Para o vírus Chikungunya, von Rhein e colaboradores (2015) mostraram que 10,79 μM de curcumina possui a capacidade de inibir em 50% da replicação deste vírus. Já o trabalho desenvolvido por Mounce e colaboradores (2017) demonstrou que concentrações acima de 100 nM de curcumina tem a capacidade de inibir significativamente a replicação do vírus Chikungunya e do vírus Zika. Esta inibição ocorreu de forma dose-dependente, com a maior inibição no grupo de células tratadas com 5 μM de curcumina.

Além disso, há registros da sua ação neuroprotetora. Nos experimentos realizados por Yang e colaboradores (2014), a curcumina reduziu a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α por células BV2 após estímulos inflamatórios. De forma semelhante, a curcumina apresentou um efeito neuroprotetor sobre os neurônios SH-SY5Y após estímulo com paraquat, um agente neurotóxico (Jaroonwitchawan e cols, 2017). Segundo os autores, o efeito protetor da curcumina estava associada com a ativação da autofagia. Entretanto, o trabalho desenvolvido por Huang e colaboradores (2018) mostrou o contrário. Segundo os autores, em modelos experimentais de isquemia cerebral, a administração da curcumina reduziu a expressão de LC3 pelas células do tecido neuronal, com redução também de mediadores inflamatórios, como IL-1 β .

JUSTIFICATIVA

Os numerosos casos de microcefalia e de outras complicações neurológicas decorrentes da infecção pelo vírus Zika no Brasil foram alarmantes. Mesmo sendo um vírus conhecido desde 1947, por causa dos poucos episódios de epidemias e a baixa gravidade, a doença não havia alarmado a comunidade científica anteriormente para a necessidade de maiores estudos sobre os seus mecanismos imunopatogênicos. Por isso, pouco se sabe a respeito do seu ciclo biológico, de quais mecanismos são essenciais para a sua replicação e possíveis formas de tratamento da doença e de prevenção à microcefalia. Portanto, é necessário um estudo aprofundado elucidando os mecanismos imunológicos desencadeados no sistema nervoso central durante a infecção, entre eles, o papel da micróglia nas neuropatologias observadas na infecção pelo ZIKV.

Ademais, visto o relato sobre o efeito antiviral da curcumina na infecção pelo vírus Zika (Mounce e cols, 2017), é interessante avaliar quais os mecanismos antivirais exercidos por essa molécula, esclarecendo os mecanismos de lesão tecidual desencadeados pelo vírus e se há indícios de que a curcumina poderia contribuir para diminuir as lesões por esse flavivírus.

OBJETIVOS

3.1. Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da curcumina no tratamento de micróglias infectadas ou não pelo vírus Zika.

3.2. Específico

- Avaliar se a curcumina exerce toxicidade sobre a micrógliã não infectada por meio da avaliação da viabilidade celular e do tipo de morte induzida;
- Avaliar se o vírus Zika tem efeito citopático sobre a célula infectada e a influência da curcumina sobre esse efeito por meio da avaliação da viabilidade celular e do tipo de morte induzida;
- Avaliar se a autofagia está ativada na micrógliã durante a infecção pelo vírus Zika e se a curcumina é capaz de modificar esse mecanismo na célula infectada por meio da expressão de LC3 e quantificação do vírus;
- Avaliar qual a influência da infecção com o vírus Zika sobre os mecanismos de resposta da micrógliã e a influência da curcumina sobre esses mecanismos pela avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio, de citocinas e de corpúsculos lipídicos.

METODOLOGIA

4.1. Delineamento experimental

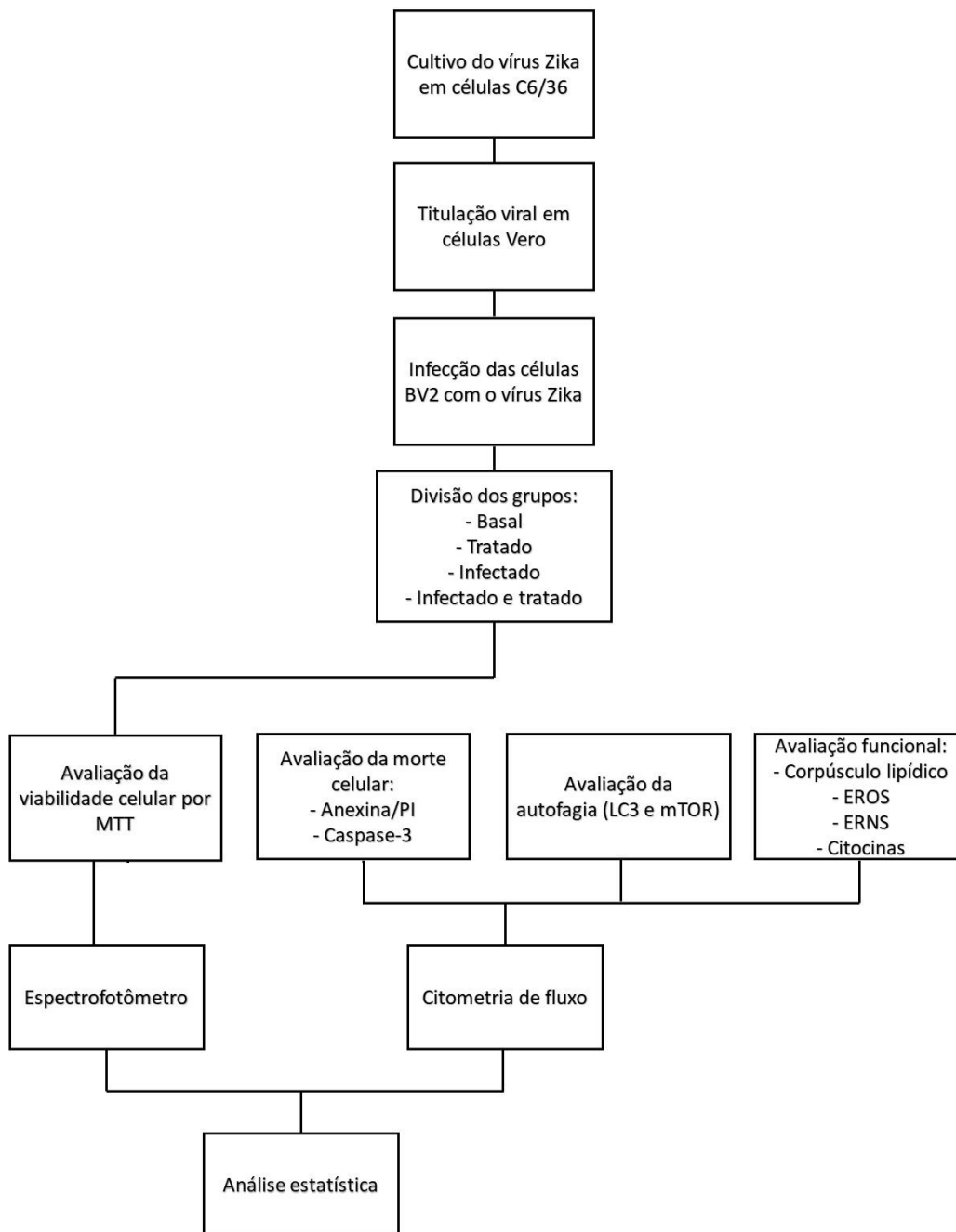


Figura 2: Fluxograma dos experimentos

Para avaliar a influência da curcumina em micróglia infectada pelo vírus Zika, os estudos foram divididos em três etapas. Na primeira etapa, primeiro

foi realizada a expansão do Vírus Zika nas células C6/36 (item 4.2.2) e em seguida, a titulação para definição posterior do MOI foi realizada em células Vero (Item 4.3). Em uma segunda etapa, foram padronizadas as condições experimentais referentes às concentrações da curcumina utilizadas nos tratamentos (itens 4.4.1 e 4.4.2). Na terceira etapa foi realizada a infecção *in vitro* das micróglias murinas de linhagem BV2 pelo vírus Zika (item 4.5.1), para as seguintes avaliações: viabilidade celular (item 4.5.4), indução da morte por necrose e apoptose (item 4.5.5), indução da autofagia (item 4.5.6), produção de Espécies Reativas de Nitrogênio (item 4.5.7) e Oxigênio (item 4.5.8), produção de corpúsculos lipídicos (item 4.5.9) e produção de citocinas (item 4.5.10).

Em todos os experimentos realizados da terceira etapa, foi acrescentado um grupo com o inibidor e/ou estímulo da via estudada. Os experimentos foram repetidos três vezes e durante todo o cultivo de células, do vírus Zika e experimentos de infecção e tratamento, foram utilizados reagentes e materiais estéreis em ambiente igualmente estéril. A descrição de todos os reagentes utilizados está detalhada no anexo de reagentes.

4.2. Linhagens celulares, vírus e estímulos inflamatórios utilizados

4.2.1. Vírus Zika

A amostra do vírus (ZIKV PE 243) foi gentilmente doada pelo pesquisador Dr. Alexandre Vieira Machado, pesquisador do Instituto René Rachou-FIOCRUZ- Belo Horizonte - MG. Antes da sua utilização, o vírus foi mantido em meio de cultura Leibovitz's L-15 Medium (Gibco) na temperatura de -80°C.

4.2.2. Células C6/36

As células C6/36, linhagem celular originária de larva neonata de mosquito *Aedes albopictus*, provenientes do banco de materiais biológicos da René Rachou – FIOCRUZ (Belo Horizonte – MG), foram gentilmente cedidas pelo

pesquisador Dr. *Alexandre Vieira Machado*. As células foram expandidas e mantidas em cultivo em estufa BOD 28°C, em meio Leibovitz's L-15 Medium (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de gentamicina (Gibco), com ajuste para o pH 7,6. As C6/36 foram utilizadas para replicação viral quando alcançaram a confluência de 70-80%. Para a infecção, 100 µL do estoque de vírus Zika foi acrescentado à cultura de células acima e as mesmas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente por 6 dias. Após o sexto dia, o sobrenadante da cultura foi centrifugado, filtrado em membrana de 0,22 µm e separado em alíquotas de 100 µL, armazenados em freezer à -80°C. Dessas alíquotas, duas foram retiradas aleatoriamente para a titulação.

4.2.3. Células Vero

As células Vero, linhagem celular originária de rim de macaco *Cercopithecus aethiops* (macaco verde africano), provenientes do banco de materiais biológicos do Instituto René Rachou – FIOCRUZ (Belo Horizonte – MG), foram gentilmente cedidas pelo pesquisador Dr. *Alexandre Vieira Machado*. As células foram mantidas em cultivo em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose* (DMEM), suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), pH 7,2, em estufa 37°C, com 5% de CO₂. Quando o cultivo alcançava a confluência máxima de 80%, uma passagem era realizada e as células eram mantidas nas mesmas condições. Foram realizados pelo menos duas passagens antes da utilização nos experimentos.

4.2.4. Micróglias Murinas BV2

Foram utilizadas micróglias hipocampais de camundongo C57BL/6 da linhagem BV2 (figura 3), gentilmente cedidas pelo pesquisador Dr. Enrique Roberto Argañaraz, do Laboratório de Virologia Molecular da Universidade de Brasília. As células foram mantidas em cultivo até alcançarem a confluência

máxima de 80%, em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina e 3,7g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), pH 7,2 e o crescimento foi realizado em estufa 37°C, com 5% de CO₂. Quando o cultivo alcançava a confluência máxima de 80%, um repique era realizado e as células eram mantidas nas mesmas condições. Foram realizados pelo menos 2 repiques antes da utilização nos experimentos.

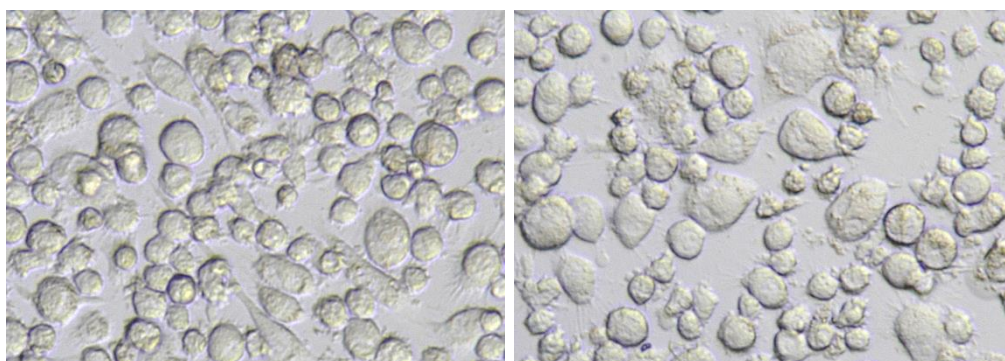


Figura 3: Micróglia murinas hipocâmpais da linhagem BV2 com aumento de 40x. Fotos capturadas pelo microscópio Nikon Eclipse Ts2, no Laboratório de Imunologia Celular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

4.3. Titulação do vírus Zika

A titulação do vírus foi realizada pelo método de quantificação em placa utilizando as células Vero. Após alcançada a confluência de 80% na cultura, as células foram transferidas para tubo tipo Falcon de plástico de 15 mL. O tubo era centrifugado a 200g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e as células eram ressuspensas em 1 mL de DMEM estéril, pH 7.2, sem o acréscimo de soro fetal bovino (DMEM incompleto). Em seguida, uma alíquota de 20 µL do meio era diluída em 180 µL da solução de nigrosina 0,05% para contagem em câmara de Neubauer. As células foram então ressuspensas para a proporção de $2,5 \times 10^5$ células em 500 µL do meio DMEM incompleto e em seguida foram distribuídas por poço, em placa de 6 poços. Em função da dinâmica de crescimento deste tipo celular, após 24 horas em multiplicação, foi estimado que as células estavam em uma concentração de 5×10^5 . Paralelamente, foi feita uma diluição seriada nas concentrações de

1×10^{-1} até 1×10^{-5} de cada uma das duas alíquotas do vírus estocado pós-crescimento em C6/36, em duplicata para obtenção do título.

Então, foram adicionados aos poços 100 μ L das diluições das alíquotas de vírus, incubados em câmara úmida a 37°C e 5% de CO₂ por 1 hora, com homogeneização delicada a cada 15 minutos, permitindo a adsorção do vírus às células. Após, foi adicionado em cada poço 3 mL de meio semissólido carboximetilcelulose (CMC) a 2% e a placa foi mantida em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, por 6 dias, com controle diário de mudanças de pH e contaminação. No sexto dia, a placa foi fixada *overnight* com paraformaldeído 3% e depois lavada em água corrente, corada com cristal violeta por 2 horas e em seguida novamente lavada e secada espontaneamente. Para obtenção do título, foram contadas as áreas circulares de luscência no poço que apresentasse a melhor visualização da formação das placas virais, dependendo da diluição do vírus utilizada (Figura 4). O valor do MOI foi obtido em unidades formadores de placa por mililitro (PFU/mL) pela fórmula:

$$Título = P \times F \times 10 \times \left(\frac{PFU}{mL} \right)$$

P: Média do número de placas virais 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

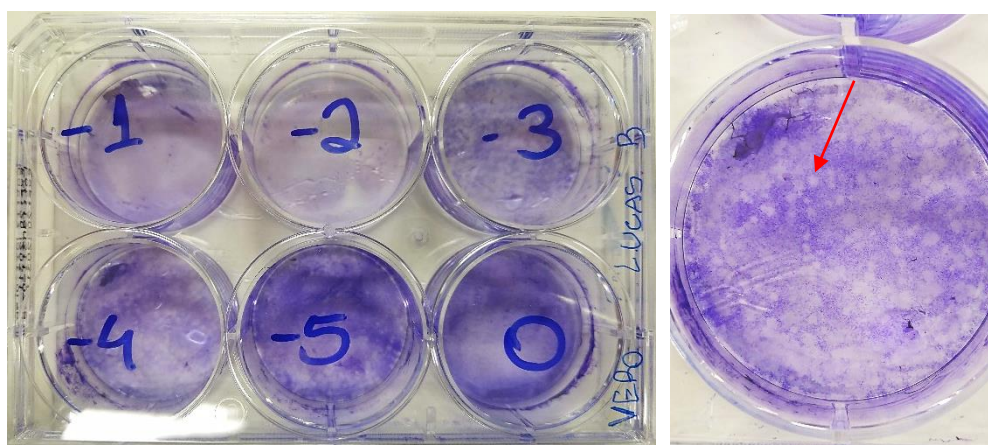


Figura 4: Placa de titulação em células Vero. À esquerda, cada poço representa uma diluição do Vírus Zika. À direita, observa-se com detalhes as formações das placas virais.

4.4. Padronização das condições experimentais

4.4.1. Avaliação do efeito citotóxico da curcumina sobre as micróglias BV2 por ensaio de MTT

Com o intuito de determinar as melhores condições experimentais referentes às concentrações da curcumina, foi realizado o ensaio de citotoxicidade pela redução do tetrazólio. Este teste baseia-se na redução do 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) pelas desidrogenases mitocondriais das células ativas, gerando os sais de formazam, cristais com coloração violeta, insolúveis em água e detectáveis em espectrofotômetro entre 512 e 587 nm (Stockert e cols, 2018).

Para tal, foram incubadas $2,5 \times 10^4$ células BV2 por poço em placa estéril de 96 poços de fundo chato, com meio DMEM estéril, suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e 3,7g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), pH 7,2, sem o acréscimo de soro fetal bovino, em câmara úmida a 37°C e 5% de CO_2 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 e os poços lavados duas vezes com solução tamponada fosfatada (PBS) estéril pH 7,2 a 37°C. Em seguida, as células

foram incubadas em câmara úmida a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas com diferentes concentrações da curcumina. Neste momento, a curcumina foi primeiro solubilizada para a concentração de 10 nM utilizando 0,01% de dimetilsulfóxido (DMSO) e, em seguida, diluída em meio DMEM estéril, suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina e 3,7g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), pH 7,2.

A curcumina foi diluída seriadamente a partir da maior concentração não citotóxica encontrada na literatura (Mounce e cols, 2017; Lin e cols, 2019; Yang e cols, 2017). As concentrações da curcumina utilizadas no experimento foram: 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,62 µM, 0,31 µM e 0,15 µM. Ao experimento foram acrescentados um grupo controle (células sem tratamento) e um grupo tratado com DMSO a 0,01%.

Passado o tempo de incubação, foram acrescentados aos poços 10 µL da solução de MTT diluído em água destilada estéril, na concentração de 5 mg/mL, seguido de nova incubação à 37°C em câmara úmida com 5% de CO₂, ao abrigo da luz, por 2 horas. Decorrido este tempo, o sobrenadante foi desprezado e acrescentado 50 µL de DMSO aos poços para lisar as células e solubilizar os cristais de formazam. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Spectramax plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) à 570 nm. O experimento foi realizado em triplicatas e a viabilidade celular foi calculada de acordo com a fórmula:

$$Viabilidade = \frac{Absorbância\ do\ grupo\ tratado}{Média\ da\ absorbância\ do\ controle} \times 100\ %$$

4.4.2. Avaliação do efeito citotóxico da curcumina sobre as micróglias BV2 pelo ensaio de apoptose/necrose

Para confirmar os dados obtidos pelo teste de MTT, foi realizado o teste de avaliação da apoptose/necrose através dos marcadores anexina V e iodeto de propídio (PI). O PI é uma molécula com capacidade de atravessar a membrana de células mortas e se ligar covalentemente entre os pares de base do DNA, marcando-os com fluorescência vermelha. Como esta molécula não atravessa a membrana de células vivas e em apoptose inicial (Rieger e cols, 2011), ela foi utilizada para diferenciar as células vivas das células mortas. Já a anexina V-FITC é uma molécula que se liga à fosfatidilserina, um lipídeo natural presente na face interna da membrana celular. Quando a célula entra em apoptose, a fosfatidilserina é externalizada, permitindo a sua ligação à anexina, uma molécula que também não possui a capacidade de atravessar a membrana celular, marcando-a com fluorescência verde.

Para tal, foram incubadas $2,5 \times 10^4$ células BV2 por poço em placa estéril de 96 poços de fundo chato, com meio DMEM estéril, suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e 3,7g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), pH 7,2, sem o acréscimo de soro fetal bovino, em câmara úmida a 37°C e 5% de CO_2 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 e os poços lavados duas vezes com PBS estéril a 37°C. Em seguida, as células foram incubadas em câmara úmida a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas com diferentes concentrações da curcumina. Neste momento, a curcumina foi primeiro solubilizada a 10 nM com DMSO e, em seguida, diluída em meio DMEM estéril, suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina e 3,7g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), pH 7,2. A curcumina foi diluída seriadamente para obtenção das concentrações de tratamento conforme descrito no item 4.4.1.

Passado o tempo de tratamento, o sobrenadante e as células foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas a 200 g por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspensão com 100 μL de PBS à 37°C, pH 7,2 e mantido por 5 minutos em temperatura ambiente. Após isto, foi acrescentado em cada tubo 1 μL do marcador iodeto de propídio

e 1 µL de anexina, seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após este tempo, foi acrescentado 400 µL de PBS, pH 7,2, temperatura ambiente.

A intensidade de fluorescência do PI e do FITC em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa DIVA versão 7 (BD Bioscience) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi obtida após o tratamento dos dados no programa FlowJo™ versão 10.6.1. O experimento foi realizado em triplicata e a viabilidade celular foi calculada através da frequência de células em cada grupo.

4.5. Procedimentos realizados com as micróglias BV2

4.5.1. Adesão e infecção das células BV2

Para todos os procedimentos de avaliação da influência da curcumina na infecção de células BV2 com o vírus Zika foram realizadas as seguintes etapas: a) etapa de adesão: após o cultivo das células BV2 como descritos no item 4.2.4., estas foram lavadas com meio DMEM estéril, suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e 3,7g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), pH 7,2, sem o acréscimo de soro fetal bovino, quantificadas em hematocitômetro e incubadas em placa estéril de 96 poços de fundo chato, na concentração de 2,5 x 10⁴ células por poço para o teste de MTT e 1 x 10⁶ células por poço para os demais procedimentos, por 2 horas em câmara úmida a 37°C e 5% de CO₂ para adesão das células ao fundo da placa. Passado este tempo, o sobrenadante foi desprezado para remoção das células não aderidas e iniciou-se a etapa de adsorção; b) etapa de adsorção: para a infecção, as células foram incubadas com 50 µL de meio DMEM estéril, suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e 3,7g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), pH 7,2, contendo o vírus Zika na concentração de 0,1

partículas virais por células (MOI 0,1) e 1 partícula viral por célula (MOI 1), pelo período de 1 hora, mantidas em câmara úmida à 37°C e 5% de CO₂, com homogeneização a cada 15 minutos para proporcionar a adsorção do vírus às células.

4.5.2. Tratamento das células

Após o período de adsorção do vírus, as células foram lavadas com PBS pH 7,2 e incubadas com diferentes concentrações da curcumina diluída em meio DMEM estéril, suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e 3,7g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), pH 7,2, sem o acréscimo de soro fetal bovino, pelo período de 24 horas, em câmara úmida à 37°C com 5% de CO₂. As concentrações de curcumina utilizadas foram de 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,62 µM e 0,31 µM que determinadas a partir dos resultados obtidos pelos experimentos descritos nos itens 4.4.1. e 4.4.2.

4.5.3. Avaliação do efeito protetor da curcumina sobre as células BV2 durante a infecção com o vírus Zika por MTT

Para avaliar o efeito protetor da curcumina sobre as micróglia BV2 infectadas com o vírus Zika, foi realizado o teste de citotoxicidade pela redução do tetrazólio (MTT). Neste experimento, as micróglia foram infectadas pelo vírus Zika com MOI 0,1 e MOI 1, com tempo de adsorção de 1 hora, seguido pelo tratamento com a curcumina em diferentes concentrações por 24 horas.

Para isso, primeiro foram realizadas as etapas de adesão, infecção e tratamento das células BV2, conforme descrito nos itens 1.4.1. e 1.4.2. Após estas etapas, foi acrescentado aos poços 10 µL da solução de MTT diluído

em água destilada estéril, na concentração de 5 mg/mL, seguido de nova incubação à 37°C em câmara úmida com 5 % de CO₂, ao abrigo da luz, por 2 horas. Decorrido este tempo, o sobrenadante foi desprezado e foi acrescentado 50 µL de DMSO aos poços para lisar as células e solubilizar os cristais de formazam. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Spectramax plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. O experimento foi repetido três vezes e a viabilidade celular foi calculada de acordo com a fórmula:

$$Viabilidade = \frac{Absorbância\ do\ grupo\ tratado}{Média\ da\ absorbância\ do\ controle} \times 100\ %$$

Os resultados foram apresentados como porcentagem de células viáveis em relação às células basais.

4.5.4. Avaliação do efeito protetor da curcumina sobre as micróglias BV2 durante a infecção com o vírus Zika pelo teste de apoptose/necrose

Para avaliar o efeito protetor da curcumina sobre as micróglias BV2 infectadas com o vírus Zika, foi realizado o teste de avaliação da morte celular pela marcação com anexina-FITC e iodeto de propídio. Neste experimento, as micróglias foram infectadas pelo vírus Zika com MOI 1, com tempo de adsorção de 1 hora, seguido pelo tratamento com a curcumina em diferentes concentrações por 24 horas.

Para isso, primeiro foram realizadas as etapas de adesão, infecção e tratamento das células BV2, conforme descrição dos itens 1.4.1. e 1.4.2. Após estas etapas, o sobrenadante e as células foram transferidas para microtubos

de 1,5 mL e centrifugadas a 200 g por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi suspenso por 100 µL de PBS à 37°C, pH 7,2, e mantido por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi acrescentado em cada tubo 1 µL do marcador iodeto de propídio e 1 µL de anexina-FITC, seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, foi acrescentado 400 µL de PBS e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

A intensidade de fluorescência do PI e do FITC em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa DIVA versão 7 (BD Bioscience) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi obtida após o tratamento dos dados no programa FlowJo™ versão 10.6.1. O experimento foi realizado em triplicata e a viabilidade celular foi calculada através da frequência de células em cada grupo.

4.5.5. Preparo das células para citometria de fluxo

Para os experimentos de imunomarcacão e aquisicão em citômetro de fluxo, é necessário a realizacão de uma etapa de fixacão, bloqueio dos sítios inespecíficos e permeabilizacão das células. Essas etapas foram realizadas para a quantificacão das proteínas caspase-3, LC3 e mTOR e para a detecçã da glicoproteína-E de Flavivírus presente no citoplasma das células infectadas.

Para isso, após a adesão, infecçã (item 4.5.1) e tratamento das células (item 4.5.2), o sobrenadante foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 a 37°C, seguido pela etapa de fixacão, com a adicão de 200 µL da soluçã de paraformaldeído a 1 % em PBS pH 7,2, incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a fixacão, o sobrenadante foi removido e as células foram novamente lavadas duas vezes com PBS. Entã, iniciou-se a etapa de bloqueio dos sítios inespecíficos com a adicão de 200

μL da solução de 2% de albumina fetal bovina (BSA) em PBS pH 7,2 por 20 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as células foram permeabilizadas com a solução de 0,2% de triton X-100 por 20 minutos à temperatura ambiente. Ao final, as células estavam prontas para a realização da imunomarcação com os anticorpos primários.

4.5.6. Quantificação do vírus Zika e das proteínas caspase-3, LC3B e mTOR por citometria de fluxo.

A quantificação do vírus Zika e a expressão das proteínas caspase-3, LC3B e mTOR em células BV2 foram determinadas por marcação imunofluorescente com detecção por citometria de fluxo. Cada marcação foi realizada em placas distintas. Nestes experimentos, as células foram aderidas e infectadas como descrito pelo item 4.5.1, seguido pelo tratamento com a curcumina, descrito no item 4.5.2. Após estas etapas, as células foram fixadas, bloqueadas e permeabilizadas como descrito pelo item 4.5.3.

Após as etapas de adesão, bloqueio e permeabilização, em cada poço foi adicionado 0,25 μL do anticorpo primário (tabela 1), diluído em 200 μL de solução de 2 % de BSA em PBS, pH 7,2 (PBS/BSA), por 24 horas à 6°C. Passado o período de incubação, as células foram novamente lavadas duas vezes com PBS 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 PBS, pH 7,2, por 15 minutos à temperatura ambiente. Após este procedimento, as células foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos e então incubadas com 0,2 μL do anticorpo secundário marcado com fluorocromo (tabela 1), diluído em 200 μL da solução de 2 % de BSA em PBS, 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 PBS e foi adicionado 200 µL da solução PBS/BSA, seguido de homogeneização para desaderência das células do fundo da placa. A intensidade de fluorescência dos marcadores em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa DIVA versão 7 (BD Bioscience) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi obtida após o tratamento dos dados no programa FlowJo™ versão 10.6.1. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram calculados através da diferença de MFI em cada grupo.

Tabela 1: Relação de anticorpos utilizados nos experimentos para marcação de autofagia, apoptose e quantificação viral

Antígenos Intracelulares		
Proteína Alvo	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário
Glicoproteína-E de Flavivírus	Anticorpo monoclonal anti-Glicoproteína-E de Flavivírus produzido em camundongo	Anticorpo secundário policlonal anti-IgG de camundongo produzido em cabra e marcado com o fluorocromo FITC
Caspase 3 fosforilada	Anticorpo policlonal anti-caspase 3 fosforilada, produzido em coelho	Anticorpo secundário policlonal anti-IgG de coelho produzido em cabra e marcado com o fluorocromo FITC
LC3-B	Anticorpo policlonal anti-LC3B produzido em coelho	
mTOR	Anticorpo monoclonal anti-mTOR produzido em coelho	

4.5.7. Quantificação das espécies reativas de nitrogênio

Para a avaliação da influência da curcumina sobre a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) sobre as células BV2 durante a infecção com o vírus Zika, foi realizada a quantificação utilizando a sonda 4-amino-methylamino-2-7-difluorescein diacetato (DAF-FM diacetato), que é

permeável à membrana celular e não fluorescente. Este composto, na presença de ERNs, produz a 4-amino-methylamino-2-7-difluoresceína (DAF-FM), que apresenta fluorescência e permanece no interior celular.

Nesse experimento, as células foram primeiro aderidas e infectadas como descrito pelo item 4.5.1, seguido pelo tratamento com a curcumina, descrito no item 4.5.2. Em seguida, o sobrenadante das células foi desprezado e estas foram incubadas por 1 hora com a sonda DAF-FM diacetato diluída em PBS pH 7,2, em câmara úmida a 37°C com 5 % de CO₂, ao abrigo da luz. Passado esse tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS, pH 7,2, à temperatura ambiente e ressuspendidas com 200 µL de PBS sob as mesmas condições. Como controle positivo do experimento foi acrescentado poços contendo 100 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS) e como contraprova 6,25 nM de APDC.

A intensidade de fluorescência do marcador em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa DIVA versão 7 (BD Bioscience) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi obtida após o tratamento dos dados no programa FlowJo™ versão 10.6.1. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram calculados através da diferença de MFI em cada grupo.

4.5.8. Quantificação das espécies reativas de oxigênio

Para a avaliação da influência da curcumina sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre as células BV2 durante a infecção com o vírus Zika, foi realizada a quantificação por meio da sonda 2-7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DFC-DA), que é permeável à membrana celular e não fluorescente. Este composto, na presença de EROS, produz a 2-7-diclorofluoresceína (DCF), que apresenta fluorescência e permanece no interior celular.

Para isso, as células foram primeiro aderidas e infectadas como descrito pelo item 4.5.1, seguido pelo tratamento com a curcumina, descrito no item 4.5.2. Em seguida, o sobrenadante das células foi desprezado e estas foram incubadas por 30 minutos com a sonda DCF-DA diluída em PBS pH 7,2, em câmara úmida a 37°C e 5% de CO₂, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS, pH 7,2, à temperatura ambiente e ressuspensas com 200 µL de PBS sob as mesmas condições. Como controle positivo do experimento foi acrescentado poços contendo 10 µg/mL de zymozan e como contraprova 25 µg/mL de diapomicina.

A intensidade de fluorescência do marcador em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa DIVA versão 7 (BD Bioscience) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi obtida após o tratamento dos dados no programa FlowJo™ versão 10.6.1. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram calculados através da diferença de MFI em cada grupo.

4.5.9. Quantificação dos corpúsculos lipídicos pela sonda BODIPY

Para avaliar a influência da curcumina sobre a produção de corpos lipídicos nas células BV2 durante a infecção com o vírus Zika, foi realizado a marcação com a sonda Bodipy, um corante fluorescente com afinidade por ácidos graxos neutros de cadeias longas, presentes em corpos lipídicos. Quando estimulado por laser, a sonda Bodipy emite uma luz verde que pode ser analisada por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência. Nesse experimento, as micróglia foram infectadas pelo vírus Zika com MOI 0,1 e MOI 1, com tempo de adsorção de 1 hora, seguido pelo tratamento com a curcumina em diferentes concentrações por 24 horas.

Para isso, as células foram primeiro aderidas e infectadas como descrito pelo item 4.5.1, seguido pelo tratamento com a curcumina, descrito no item

4.5.2. Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas uma vez com PBS pH 7,2 e fixadas em paraformaldeído à 1% por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido de nova lavagem com PBS. As células foram, então, incubadas com 200 µL da sonda BODIPY na diluição de 1:5000 em PBS pH 7,2 por 30 minutos, mantido em câmara úmida à 37°C com 5% de CO₂. Logo em seguida, as células foram novamente lavadas e ressuspendidas em 200 µL de PBS pH 7,2.

A intensidade de fluorescência do marcador em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa DIVA versão 7 (BD Bioscience) e a intensidade média de fluorescência (MFI) foi obtida após o tratamento dos dados no programa FlowJo™ versão 10.6.1. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram calculados através da diferença de MFI em cada grupo.

4.5.10. Quantificação das citocinas Th1/Th2/Th17

Para avaliar a influência da curcumina na produção de citocinas das células BV2 durante a infecção pelo vírus Zika, foi realizada a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN-γ e TNF-α no sobrenadante dos cultivos celulares por meio do ensaio por beads para citometria (CBA), conforme instruções do fabricante (BD Bioscience). Este ensaio é composto por beads de captura e pelo reagente de detecção. As beads possuem tamanho e fluorescência conhecidas, e cada uma é conjugada a anticorpos específicos para a captura de uma citocina, o que possibilita a sua detecção e análise. Já o reagente de detecção é composto por uma mistura de anticorpos conjugados a ficoeritrina (PE), que promove a sinalização por fluorescência de acordo com a quantidade de analito na amostra. Quando os beads de captura e o reagente de detecção são incubado com uma amostra, é formado um complexo com beads de captura-analito-reagente de detecção e este complexo é mensurado por citometria de fluxo.

Para tal, as células foram primeiro aderidas e infectadas conforme descrição no item 4.5.1, seguido pelo tratamento com a curcumina, descrito no item 4.5.2. Após o tempo de incubação, foi transferido 50 μ L do sobrenadante de cada poço para um tubo cônico, seguido do acréscimo de 50 μ L da mistura de beads de captura e 50 μ L do reagente de detecção. As amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o tempo de incubação, foi acrescentado 500 μ L do tampão de lavagem em cada tubo, seguido de centrifugação a 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e acrescentado 300 μ L do tampão de lavagem. Foi acrescentado ao experimento uma curva de calibração contendo as seguintes concentrações de cada citocina: 0 pg/mL, 20 pg/mL, 40 pg/mL, 80 pg/mL, 156 pg/mL, 312,5 pg/mL, 625 pg/mL, 1250 pg/mL, 2500 pg/mL e 5000 pg/mL.

A intensidade de fluorescência em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa Diva versão 7 (BD Bioscience) e os dados de fluorescência foram tratados utilizando o programa FCAP array versão 3 (BD Bioscience). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como pg/mL.

4.5.11. Estratégia de detecção por citometria de fluxo

Para a quantificação das proteínas caspase 3, LC3B, mTOR e para as espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e corpúsculos lipídicos, a estratégia de detecção e análise por citometria de fluxo tomada foi em selecionar a população de interesse no gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade/complexidade (SSC) das células, a fim de excluir os debris celulares e as células que formaram grumos (*doublets*) (Figura 5). Todas as análises foram realizadas com a aquisição de 10 mil eventos e ponto de corte (*threshold*) de mil.

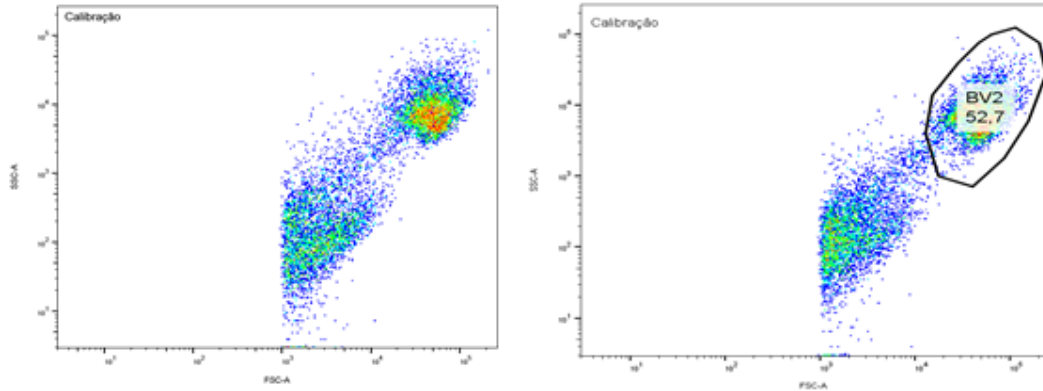


Figura 5: Seleção da população de interesse no gráfico de tamanho (FSC) por complexidade/granulosidade (SSC) das células.

Em seguida, para cada análise foi feito um histograma com a contagem de eventos (eixo Y) pela intensidade de fluorescência (eixo X), realizando a exclusão da fluorescência natural das amostras por meio da análise de células não-marcadas (Figura 6).

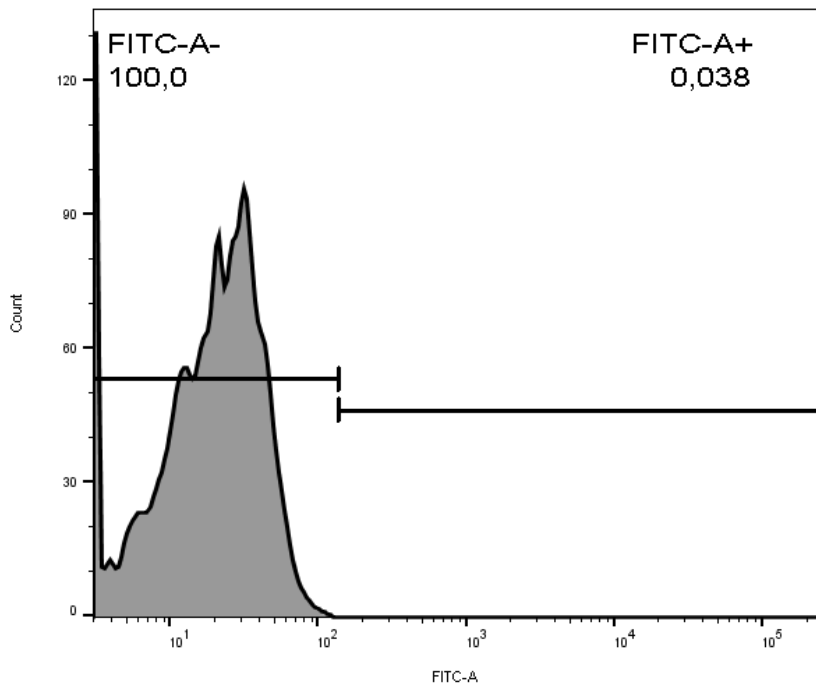


Figura 6: seleção das células positivas para a marcação.

Já para quantificação de células em necrose e apoptose pelo ensaio de marcação com a anexina e incorporação do iodeto de propídio, foi realizada a análise dos eventos totais, sem a exclusão de debris celulares e *doublets*, para que não fossem excluídas as células em processo de morte. Para esta análise também foi incluído um grupo de células não-marcadas e consideradas células PI-FITC⁻ como vivas, PI-FITC⁺ como células em apoptose e PI⁺FITC⁺ como células em necrose (Figura 7).

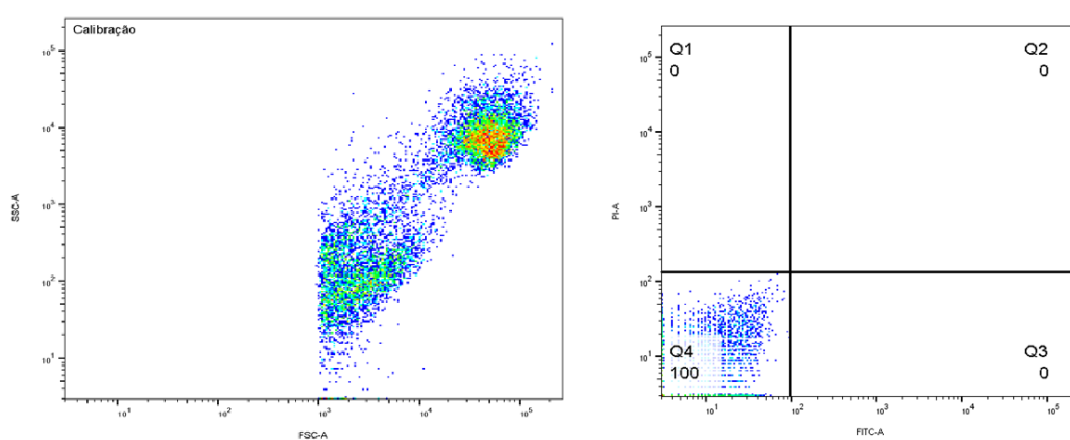


Figura 7: estratégia de detecção para a marcação com a anexina e incorporação do iodeto de propídio.

4.6. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa Graphpad Prism para Windows versão 8 (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* student quando a distribuição das amostras

foi normal, ou o teste de Mann-Whitney quando a distribuição não foi normal. As diferenças observadas foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade de erro ao aceitar a hipótese alternativa foi menor que 5% ($p < 0,05$). Nas figuras, os dados foram representados em box plot, como medianas, quartis superiores e inferiores, valores mínimos e máximos.

RESULTADOS

5.1. Influência da curcumina sobre a viabilidade das micróglias BV2

Com o objetivo de avaliar a toxicidade da curcumina sobre as micróglias BV2 e para determinar quais as melhores concentrações para prosseguir com os estudos, foi realizado o teste de MTT em diferentes concentrações da curcumina no tratamento das células, seguindo a metodologia descrita no item 4.4.1 e o teste de morte celular pela marcação da membrana celular com a anexina e a incorporação do iodeto de propídio, conforme descrito pelo item 4.4.2.

Os resultados (Figura 8) demonstraram que a concentração de 0,01% de DMSO utilizada na diluição da curcumina reduziu a mediana do metabolismo do MTT de 101,2% para 85,26%; contudo, essa redução não apresentou diferença estatística (teste *t*; $p=0,0823$). As concentrações de curcumina 0,15 μM , 0,32 μM e 0,62 μM promoveram um aumento da viabilidade das células. No tratamento com 0,15 μM de curcumina, o aumento foi 1,33 vezes o valor do basal (mediana: 134,7%; $p<0,0001$, ANOVA); 1,11 vezes quando utilizando 0,31 μM de curcumina (mediana: 112,6%; $p=0,0002$, ANOVA); e 1,1 vez maior quando utilizado 0,62 μM de curcumina (mediana: 109,6%; $p=0,0382$, ANOVA). O tratamento com 2,5 μM de curcumina também promoveu um aumento na viabilidade das micróglias BV2, com o aumento da mediana de MTT para 107,1% ($p<0,0001$, ANOVA). Já as concentrações de 1,25 μM e 5 μM não modificaram a viabilidade em relação ao basal, com mediana de 102,8% para as células tratadas com 1,25 μM de curcumina ($p=0,4632$, ANOVA) e mediana de 91,89% para as tratadas com 5 μM ($p=0,8285$, ANOVA). As concentrações de 10 μM e 20 μM reduziram drasticamente a viabilidade celular, apresentando uma mediana de atividade mitocondrial de 71,4% para as células tratadas com 10 μM ($p<0,0001$, ANOVA) e 13,1% para as células tratadas com 20 μM ($p<0,0001$, ANOVA).

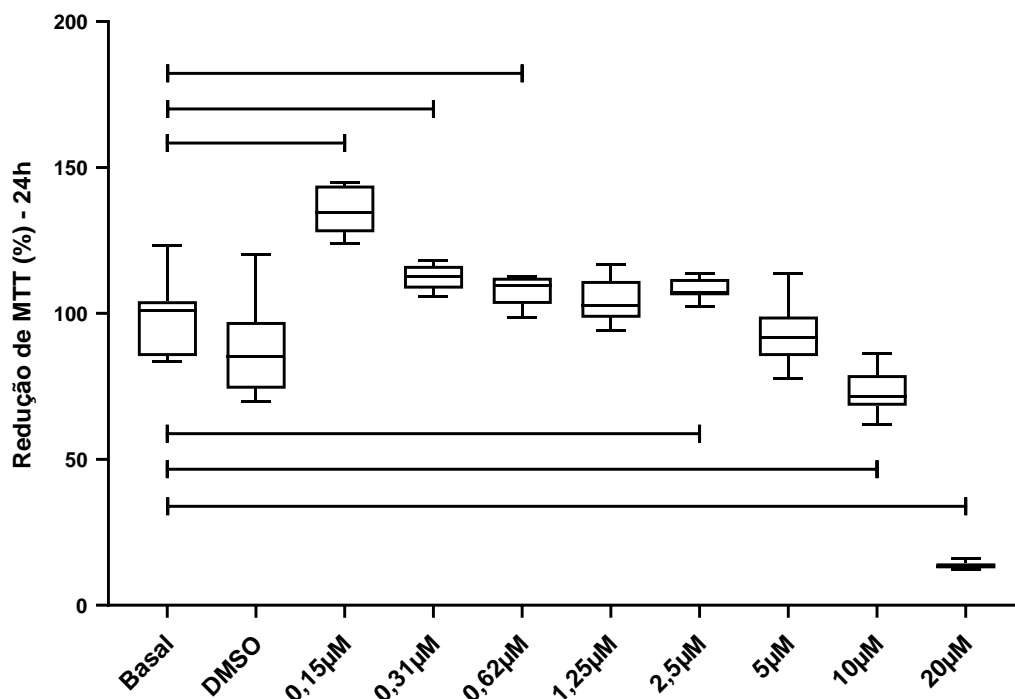


Figura 8: Influência do tratamento com diferentes concentrações da curcumina sobre a viabilidade das micróglias BV2 em cultura de 24h, avaliada pela redução do MTT. Nas concentrações de 0,15 µM, 0,31 µM, 0,62 µM e 2,5 µM, a curcumina aumentou a viabilidade das micróglias. Já as concentrações de 1,25 µM e 5 µM não alteraram a viabilidade das células em cultura. Entretanto, observou-se efeito tóxico nas concentrações de 10 µM e 20 µM. Teste ANOVA ($p < 0,0001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

Para avaliar se os resultados obtidos do teste do MTT estavam relacionados com a influência da curcumina sobre os mecanismos de morte celular, foi realizado a avaliação da apoptose/necrose pela incorporação do iodeto de propídeo e marcação com anexina, utilizando as mesmas concentrações de curcumina no tratamento das células BV2 por 24 horas. Com esse experimento, observou-se que o tratamento com 10 µM de curcumina aumentou porcentagem de células em apoptose de 1,23% para 2,67% (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 9a) e a porcentagem de células em necrose de 3,38% para 6,1% (Teste t , $p = 0,0158$; Figura 9b). De forma semelhante, o tratamento com 20 µM de curcumina aumentou a quantidade de células apoptóticas de 1,23% para 3,14% (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 9a) e a quantidade de células em necrose de 3,38% para 24,55% (ANOVA, $p < 0,0001$;

Figura 9b). Já para os tratamentos com 0,15 μM , 0,62 μM , 1,25 μM , 2,5 μM e 5 μM , não foram observadas alterações na quantidade de células em apoptose (ANOVA, $p < 0,0001$, seguido do teste Tukey para múltiplas comparações; Figura 9a) e em necrose (ANOVA, $p < 0,0001$, seguido do teste Tukey para múltiplas comparações; Figura 9b). Com estes resultados, optamos em prosseguir os experimentos realizando os tratamentos das células com a curcumina nas concentrações 0,31 μM , 0,62 μM , 1,25 μM , 2,5 μM e 5 μM .

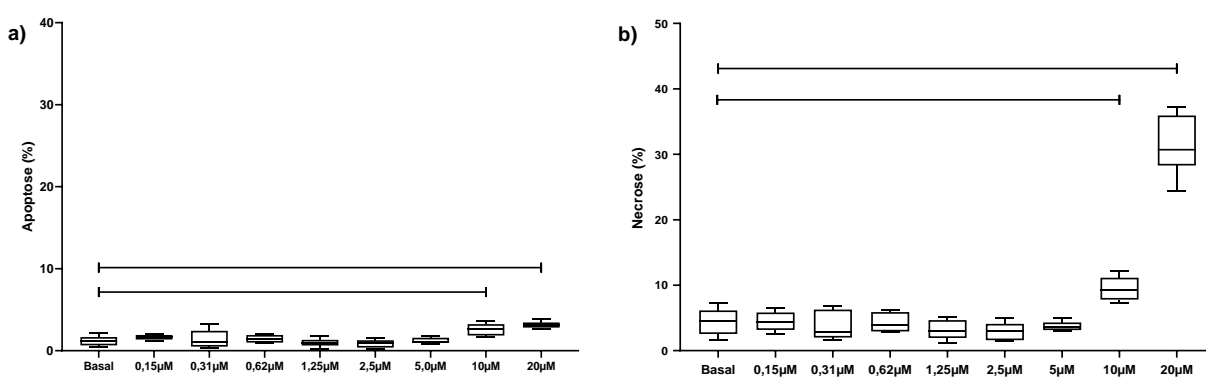


Figura 9: Influência da curcumina sobre a morte celular de micróglia BV2 em cultura de 24h. A) A curcumina nas concentrações 10 μM e 20 μM aumentou a morte das micróglia BV2 por apoptose; B) A curcumina nas concentrações 10 μM e 20 μM aumentou a morte das micróglia BV2 por necrose. Teste ANOVA ($p < 0,0001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

Com estes resultados, optamos em prosseguir os experimentos realizando os tratamentos das células com a curcumina nas concentrações 0,31 μM , 0,62 μM , 1,25 μM , 2,5 μM e 5 μM .

5.2. Efeito do vírus Zika sobre a viabilidade das micróglia BV2

Para avaliar se o vírus Zika apresenta efeito citopático sobre as micróglia, foi realizado o teste de MTT para verificar a perda ou não de viabilidade das micróglia infectadas e a avaliação do tipo de morte celular pela incorporação

do iodeto de propídio e marcação da membrana com a anexina. Observou-se que decorrido o tempo de 24 horas, a infecção das BV2 pelo vírus promoveu uma diminuição significativa da viabilidade celular, tanto na presença de MOI 0,1, quanto na presença do MOI 1 do vírus. A mediana da redução do MTT das células não infectadas (Basal) passou de 100.0% para 85,66%, quando a infecção realizada utilizando o MOI 0,1 e para 59,04%, quando foi utilizado o MOI 1 (ANOVA, $p < 0.0001$; Figura 10).

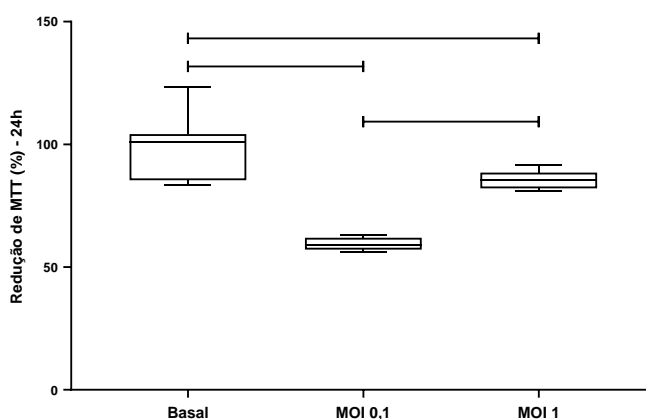


Figura 10: Efeito citopático do vírus Zika sobre a viabilidade das micróglia BV2 em cultura de 24h, avaliada pela redução do MTT. Foi observada um menor metabolismo do MTT nos grupos de células infectadas com as duas multiplicidades de infecção. Entretanto, a redução do metabolismo foi mais acentuada no grupo infectado com MOI 0,1 do que no grupo infectado com 1 MOI de vírus. Teste ANOVA ($p < 0,0001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

Para avaliar se os resultados obtidos do teste do MTT estavam relacionados com a influência da curcumina sobre os mecanismos de morte celular, foi realizado a avaliação da apoptose/necrose pela incorporação do iodeto de propídeo e marcação com anexina, utilizando as mesmas concentrações de curcumina no tratamento das células BV2 por 24 horas. Com esse experimento, observamos que a infecção com MOI 0,1 do vírus Zika aumentou a porcentagem de células em apoptose de 1,23% para 2,7% (ANOVA, $p = 0,0014$; Figura 11a), mas não alterou a porcentagem de células em necrose (ANOVA, $p = 0,2292$; Figura 11b). Já a infecção com MOI 1 não

alterou a porcentagem de micróglia BV2 em apoptose (ANOVA, $p=0,0014$, seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações, onde $p=0,1391$; Figura 11a) e em necrose (ANOVA, $p=0,2292$; Figura 11b).

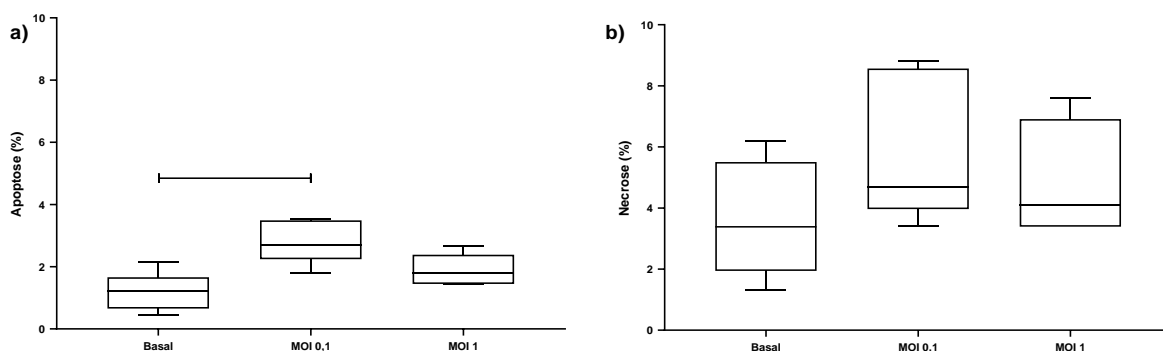


Figura 11: Influência da infecção pelo vírus Zika sobre a morte celular das micróglia BV2 em cultura de 24h. A) A infecção com MOI 0,1 do vírus aumentou a porcentagem de células em apoptose. Não foi observado alterações nesse parâmetro no grupo de células na presença de MOI 1; B) A infecção pelo vírus Zika não alterou a porcentagem de células em necrose. Teste ANOVA ($p=0,0014$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.3. Influência da curcumina sobre a viabilidade celular das micróglia BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar se a curcumina exerce um papel protetor sobre as micróglia BV2 durante a infecção com o vírus Zika, foi realizado o teste de citotoxicidade por MTT, conforme descrito pelo item 4.5.3 e o teste de necrose/apoptose pela incorporação do iodeto de propídio e a marcação da membrana celular com anexina, como descrito pelo item 4.5.4.

Conforme os resultados obtidos pelo teste de MTT, a curcumina nas concentrações de 0,31 μM , 0,62 μM e 1,25 μM apresentou um papel protetor por evitar o efeito citopático do vírus nas micróglia infectadas. O tratamento com 0,31 μM de curcumina (Figura 12) aumentou a viabilidade das micróglia infectadas com o vírus Zika MOI 0,1 de 59,04% para 79,92% e melhorou a viabilidade das micróglia infectadas com o MOI 1 de 88,49% para 97,75%,

retornando a viabilidade deste grupo de células para próximo aos níveis basais (ANOVA, $p < 0,0001$).

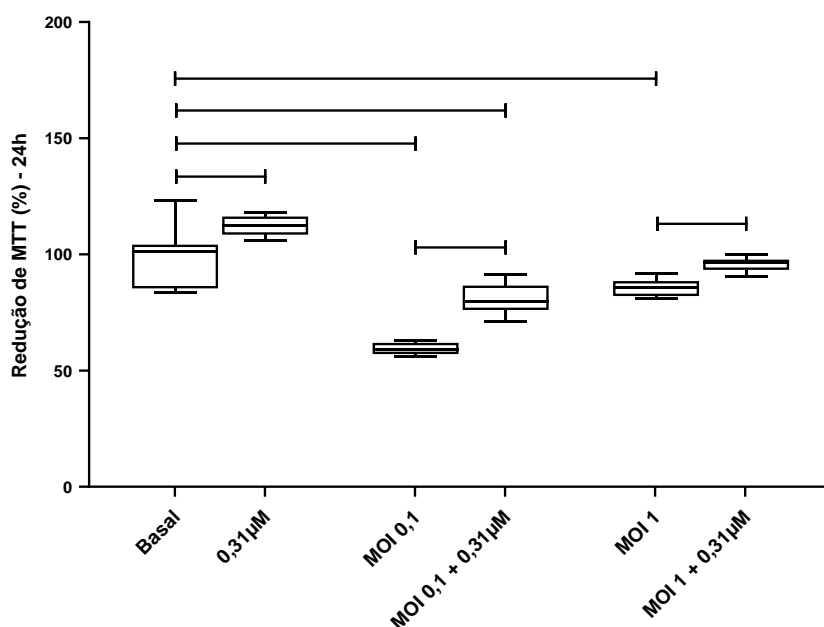


Figura 12: Efeito protetor da curcumina na concentração de $0,31 \mu\text{M}$ sobre as micróglias BV2 na presença do vírus Zika em culturas de 24h, pelo teste de redução do MTT. O tratamento recuperou parcialmente a viabilidade do cultivo infectado com MOI 0,1 do vírus e retornou à viabilidade do cultivo infectado com MOI 1 para próximo do basal. Teste ANOVA ($p < 0,0001$) seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações.

De forma semelhante, o tratamento com $0,62 \mu\text{M}$ de curcumina (Figura 13) protegeu as micróglias infectadas com MOI 0,1 de vírus Zika, por aumentar a viabilidade de 59,04% no grupo infectado para 83,37% no grupo infectado e tratado. O mesmo foi observado em relação às células infectadas com MOI 1, por aumentar a viabilidade das micróglias infectadas (88,49%) para 100,2% quando estas receberam o tratamento (ANOVA, $p < 0,0001$).

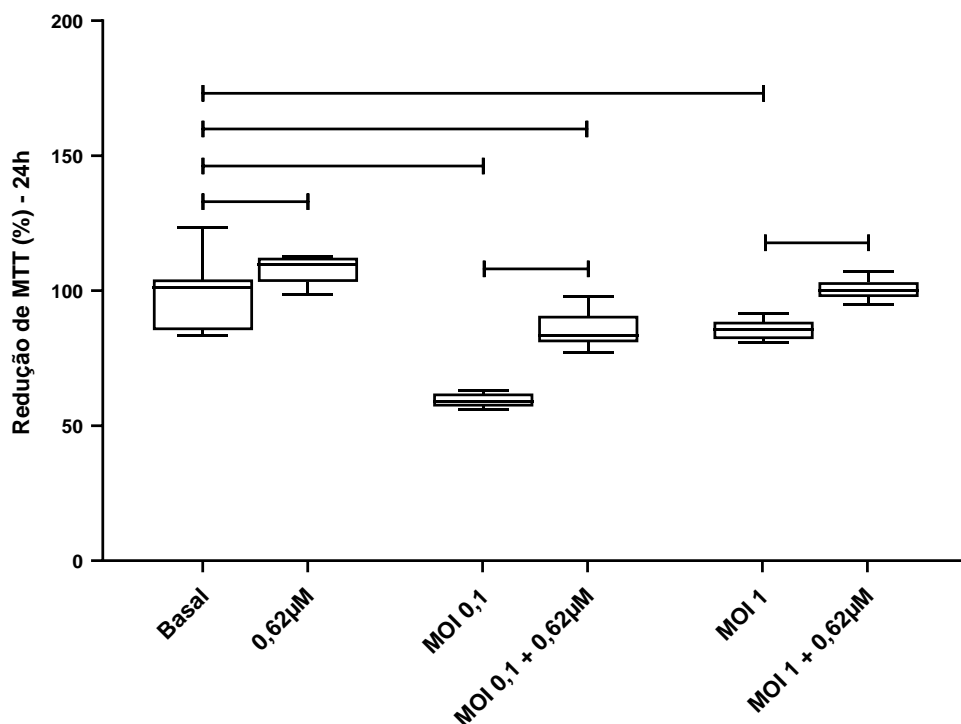


Figura 13: Efeito protetor da curcumina na concentração de 0,62 µM sobre as micróglias BV2 na presença do vírus Zika em culturas de 24h, pelo teste de redução do MTT. O tratamento recuperou parcialmente a viabilidade do cultivo infectado com MOI 0,1 do vírus e retornou à viabilidade do cultivo infectado com MOI 1 para próximo do basal. Teste ANOVA ($p < 0,0001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

O tratamento com 1,25 µM de curcumina (Figura 14) foi capaz de retornar à viabilidade das micróglias para próximo dos níveis basais nas duas condições de infecção (MOI 0,1 e MOI 1). Para as células infectadas com MOI 0,1 do vírus Zika, a viabilidade aumentou de 59,04% (grupo infectado) para 82,20 no grupo infectado e tratado. Para as células infectadas com MOI 1 do vírus Zika, a viabilidade aumentou de 85,66% (grupo infectado) para 90,98 no grupo que recebeu o tratamento (ANOVA, $p < 0,0001$).

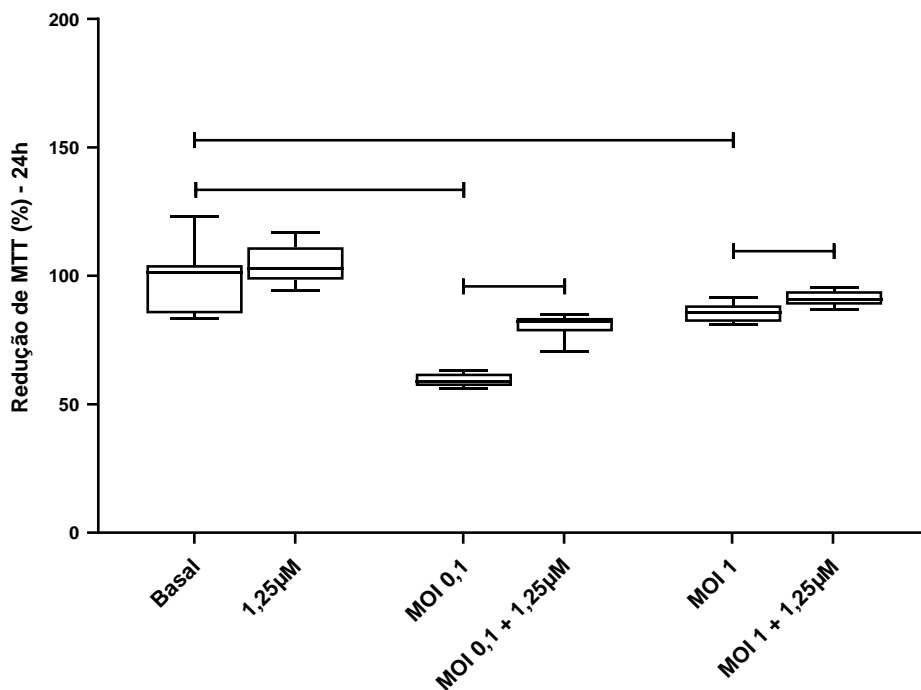


Figura 14: Efeito protetor da curcumina na concentração de 1,25 µM sobre as micróglia BV2 na presença do vírus Zika em culturas de 24h, pelo teste de redução do MTT. O tratamento recuperou a viabilidade dos cultivos infectados com MOI 0,1 e MOI 1 do vírus Zika para próximo do basal. Teste ANOVA ($p < 0,0001$) seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações.

O tratamento das micróglia BV2 com 2,5 µM de curcumina (Figura 15) melhorou a viabilidade das células infectadas com o vírus Zika no MOI 0,1 de 59,04% para 71,97%. Entretanto, esta concentração não foi capaz de aumentar a viabilidade das células infectadas com MOI 1 do vírus, mantendo a viabilidade de 85,66% em 89,11% (ANOVA, $p < 0,0001$ seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações em que $p = 0,8144$).

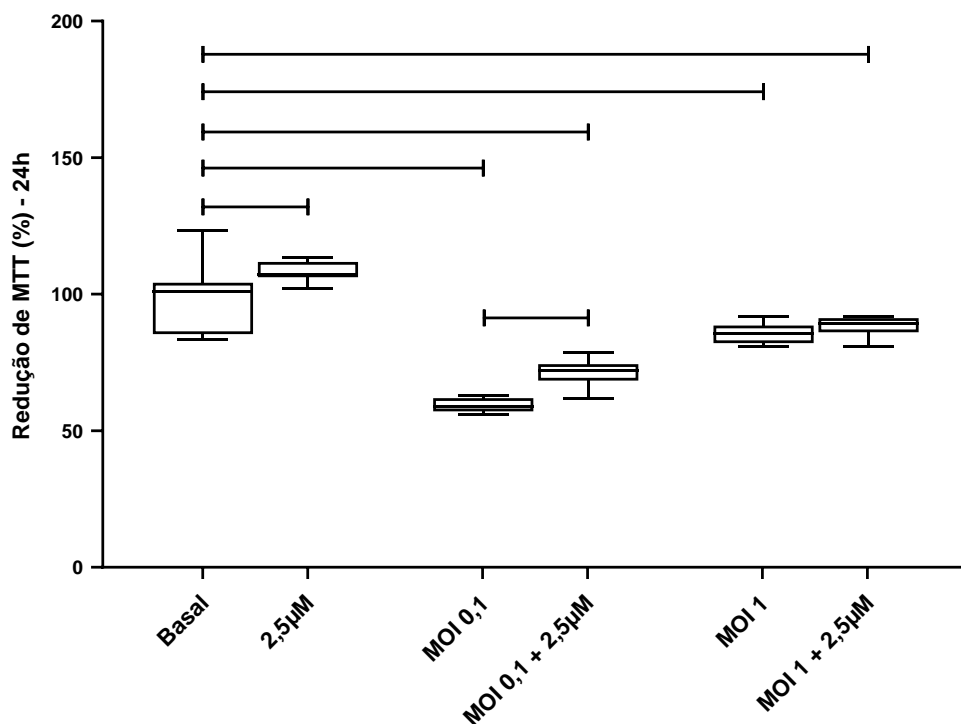


Figura 15: Efeito protetor da curcumina na concentração de 2,5 µM sobre as micróglias BV2 na presença do vírus Zika em culturas de 24h, pelo teste de redução do MTT. O tratamento recuperou parcialmente a viabilidade dos cultivos infectados com MOI 0,1 do vírus Zika, entretanto, não alterou a viabilidade do grupo de micróglias infectadas com MOI 1. Teste ANOVA ($p < 0,0001$) seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações.

Já o tratamento com a curcumina na concentração de 5 µM (Figura 16) melhorou a viabilidade das células infectadas com MOI 0,1 do vírus, aumentando de 59,04% para 67,47% (ANOVA, $p < 0,0001$). Entretanto, esta concentração reduziu a viabilidade das células infectadas com MOI 1 do vírus, diminuindo a viabilidade de 85,66% para 79,09% (Teste t , $p = 0,0069$).

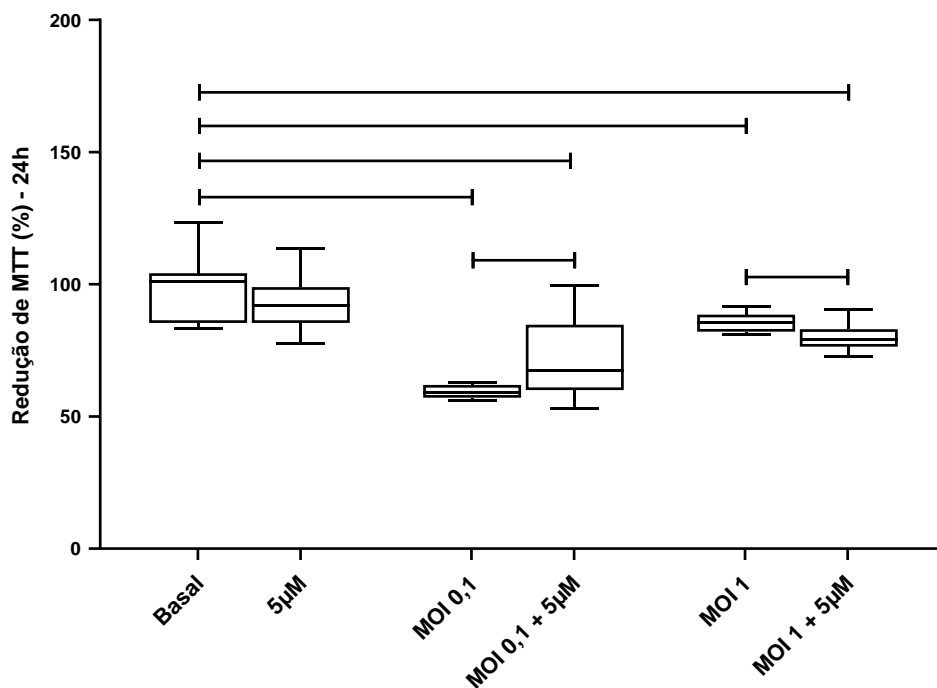


Figura 16: Efeito protetor da curcumina na concentração de 5 μM sobre as micróglia BV2 na presença do vírus Zika em culturas de 24h, pelo teste de redução do MTT. O tratamento foi capaz de recuperar parcialmente a viabilidade das micróglia BV2 infectadas com MOI 0,1 de vírus, entretanto, não alterou a viabilidade do grupo de micróglia infectadas com MOI 1. Teste ANOVA ($p < 0,0001$) seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações.

Entretanto, esses resultados não foram observados quando quantificamos as células em necrose e em apoptose pelo ensaio de incorporação do iodeto de propídio e marcação da membrana celular com a anexina. Segundo os dados, a curcumina em nenhuma concentração testada alterou a quantidade de células em apoptose (Figura 17). Já ao analisarmos a quantidade de células em necrose, nossos dados indicaram que o tratamento com 0,62 μM de curcumina no grupo de células infectadas com MOI 1 do vírus aumentou o número de células em necrose de 4,1% para 7,57% (Kruskal-Wallis, $p = 0,0035$; Figura 18b). Para as células infectadas com MOI 1 do vírus, também observamos o aumento para 14,55% quando estas células foram tratadas com 5 μM de curcumina (teste ANOVA, $p = 0,0002$; Figura 18e).

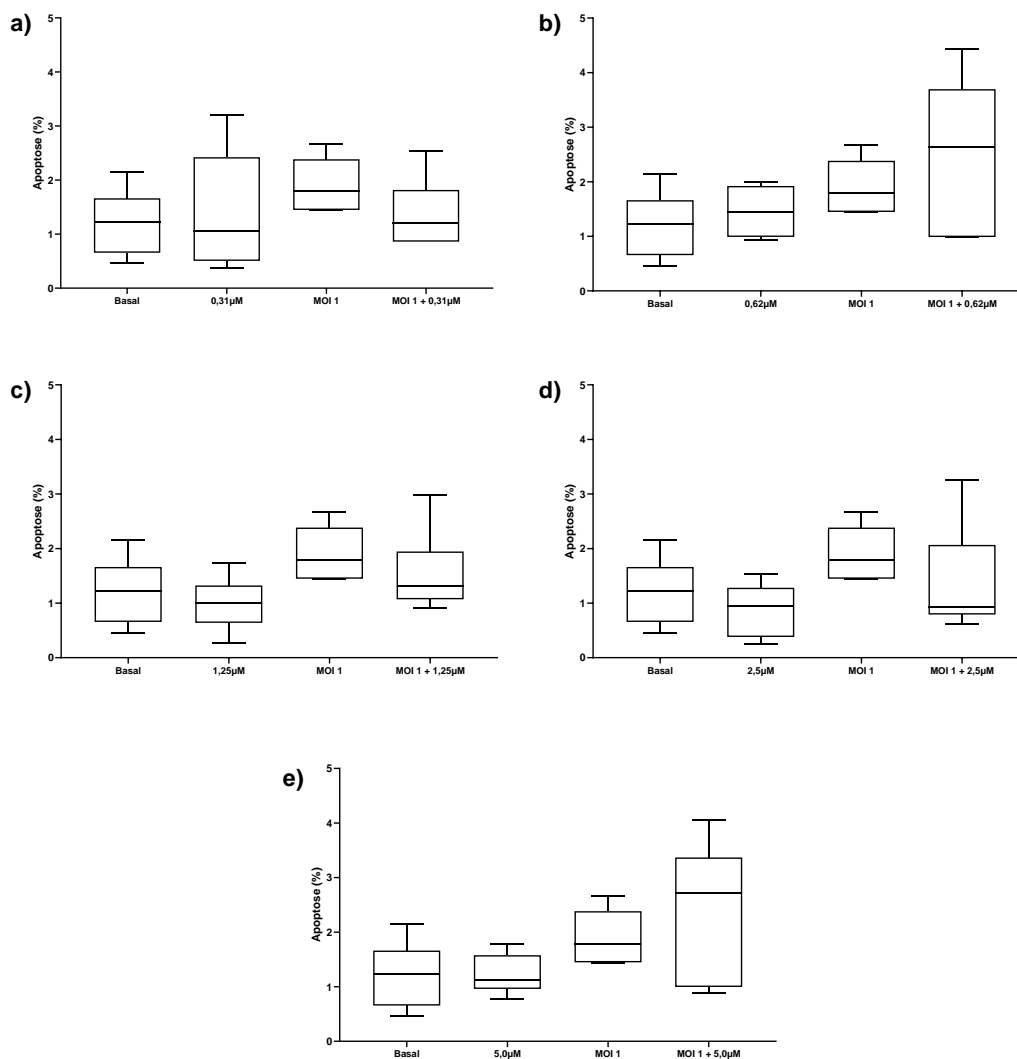


Figura 17: Influência do tratamento com a curcumina sobre a viabilidade de micróglia BV2 infectadas com vírus Zika. A) O tratamento com 0,31 μ M de curcumina não alterou a quantidade de micróglia em apoptose durante a infecção com o vírus; B) O tratamento com 0,62 μ M de curcumina não alterou a quantidade de micróglia em apoptose durante a infecção com o vírus; C) O tratamento com 1,25 μ M de curcumina não alterou a quantidade de micróglia em apoptose durante a infecção com o vírus; D) O tratamento com 2,5 μ M de curcumina não alterou a quantidade de micróglia em apoptose durante a infecção com o vírus; E) O tratamento com 5 μ M de curcumina não alterou a quantidade de micróglia em apoptose durante a infecção com o vírus. Avaliações pelo teste ANOVA ou Kruskal-Wallis seguido do teste de Tukey ou Duns para múltiplas comparações.

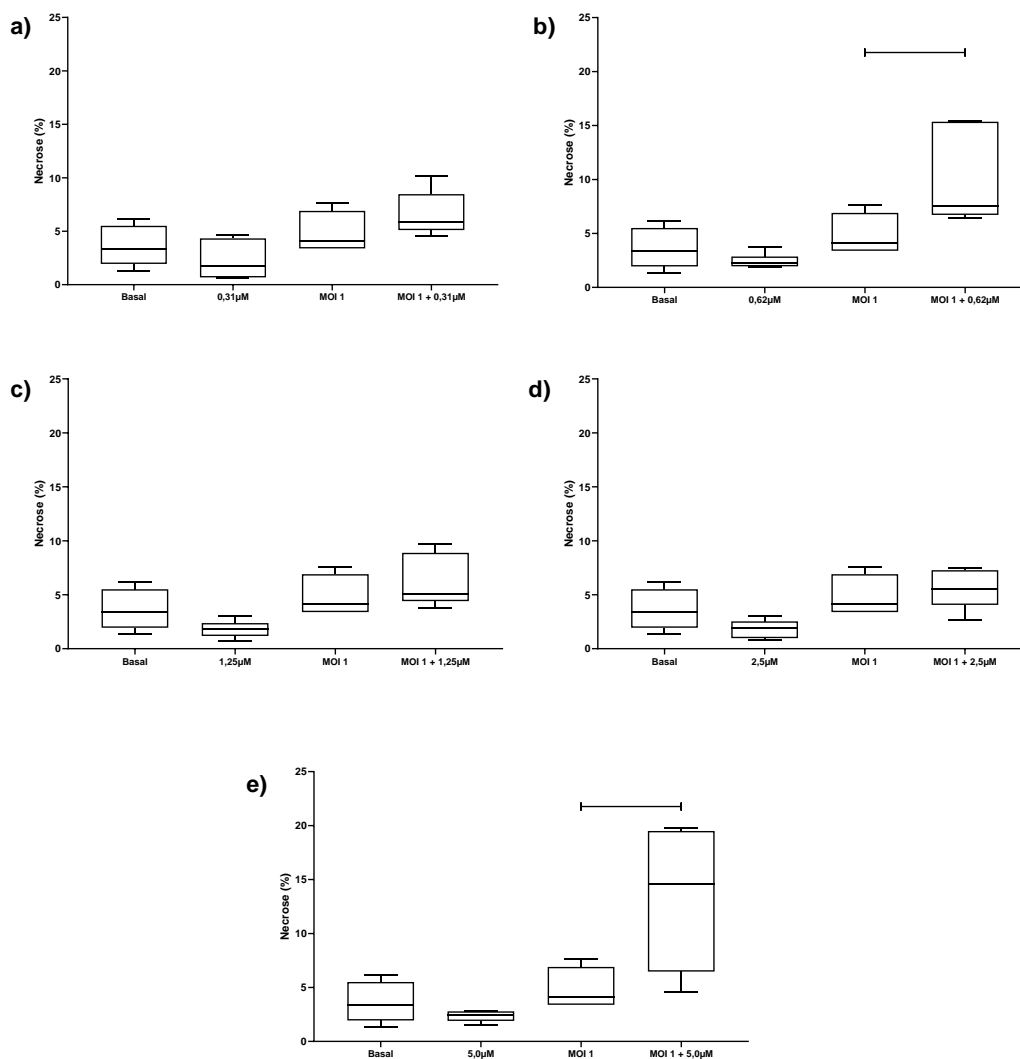


Figura 18: Influência do tratamento com a curcumina sobre a morte por necrose de micróglia BV2 infectadas o vírus Zika. A) O tratamento com 0,31 μM de curcumina não alterou a quantidade de micróglia em necrose durante a infecção com o vírus. B) O tratamento com 0,62 μM de curcumina aumentou a quantidade de micróglia em necrose durante a infecção com o vírus. C) O tratamento com 1,25 μM de curcumina não alterou a quantidade de micróglia em necrose durante a infecção com o vírus. D) O tratamento com 2,5 μM de curcumina não alterou a quantidade de micróglia em necrose durante a infecção com o vírus. E) O tratamento com 5 μM de curcumina aumentou a quantidade de micróglia em necrose durante a infecção com o vírus. Avaliações realizadas pelo teste ANOVA e Kruskal-Wallis seguido do teste de Tukey ou teste de Dunn para múltiplas comparações.

5.4. Influência da curcumina sobre a expressão da caspase-3 em micróglia durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a influência da infecção com o vírus Zika e do tratamento com a curcumina sobre ativação da via de morte celular por apoptose, foi avaliada a expressão da proteína caspase-3 fosforilada nas micróglias BV2, utilizando a metodologia descrita no item 4.5.6.

Segundo os resultados, a infecção com o vírus Zika não alterou a expressão da caspase-3 nas micróglias BV2, tanto nas células infectadas com o MOI 0,1, quanto no grupo infectado com o MOI 1 (ANOVA, $p=0,7817$; Figura 19a). O tratamento com a curcumina nas concentrações que variavam de 0,31 μM a 5 μM também não alterou a expressão da caspase-3 nas células não-infectadas (Kruskal-Wallis, $p=0,2971$; Figura 19b).

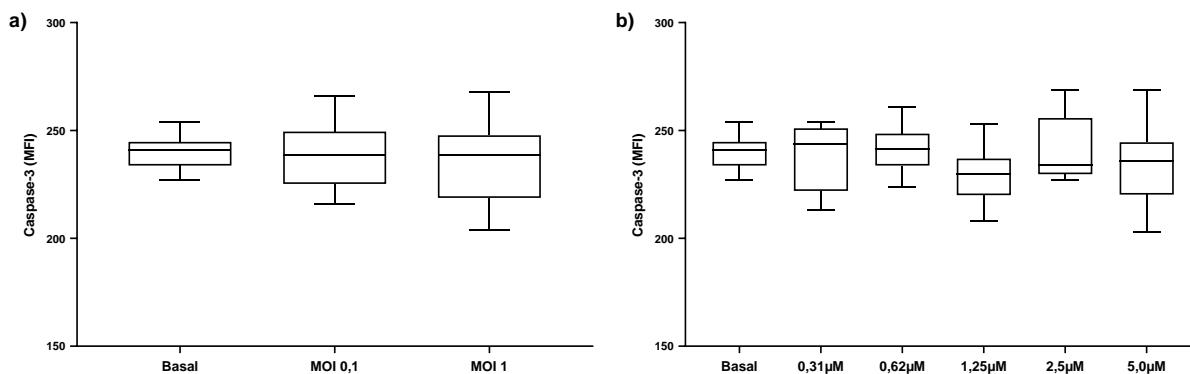


Figura 19: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na expressão da caspase-3 em cultivo de micróglias BV2 por 24h. A) A infecção pelo vírus Zika não alterou a expressão de caspase-3 pelas micróglias BV2 ($p=0,7817$); B) O tratamento com a curcumina também não alterou a expressão de Caspase-3 em todas as concentrações do fármaco testadas ($p=0,2971$); Avaliações pelo teste ANOVA ou Kruskal-Wallis seguido do teste de Tukey ou Duns's para múltiplas comparações.

Por outro lado, observou-se que o tratamento com a curcumina sobre as células infectadas promoveu a redução na expressão da caspase-3. Esse resultado ocorreu tanto em células infectadas com MOI 0,1 quanto pelo MOI 1, quando (ANOVA, $p=0,0023$ e $p<0,0001$, respectivamente) tratadas com as concentrações 0,31 μM , 0,62 μM , 1,25 μM e 2,5 μM de curcumina. Entretanto, não houve alteração na sua expressão nos grupos tratados com 5 μM de curcumina.

Segundo os dados, o tratamento com 0,31 μM de curcumina reduziu a MFI de 238,5 do grupo infectado com MOI 0,1 para 221,5 no grupo infectado e tratado (ANOVA, $p=0,0016$) e para 214 no grupo infectado com MOI 1 e tratado (Kruskal-Wallis, $p=0,0050$; Figura 20a). De forma semelhante, o tratamento com 0,62 μM reduziu a MFI de 238,5 do grupo infectado com MOI 0,1 para 201 no grupo infectado e tratado e para 206, no grupo infectado com o MOI 1 e tratado (ANOVA, $p<0,0001$; Figura 20b). Tal qual os resultados anteriores, o tratamento com 1,25 μM de curcumina das células infectadas com MOI 0,1 em relação às células somente infectadas reduziu a MFI de 238,5 para 219 e de 238,5 para 205 no grupo infectado com MOI 1 e tratado (ANOVA, $p<0,0001$; Figura 20c).

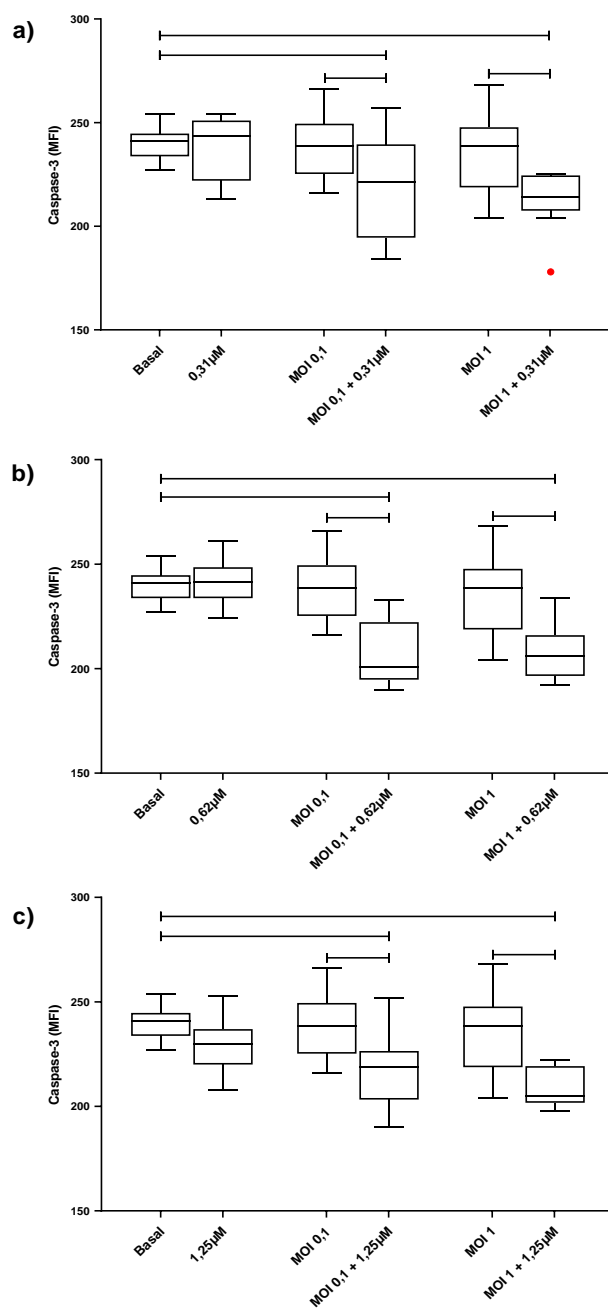


Figura 20: Influência da curcumina na expressão da caspase-3 em cultivo de micróglia BV2 por 24h na presença do vírus Zika. A) A curcumina na concentração 0,31 μM foi capaz de reduzir a expressão da caspase-3, tanto no grupo de células na presença de MOI 0,1 quanto na presença de MOI 1 do vírus Zika ($p=0,0016$ e $p=0,0050$, respectivamente); B) A curcumina na concentração 0,62 μM também reduziu a expressão da caspase-3 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus Zika ($p<0,0001$); C) A curcumina na concentração 1,25 reduziu a expressão da caspase-3 nos grupos de células infectados com MOI 0,1 e MOI 1 de vírus Zika ($p<0,0001$); Avaliações pelo teste ANOVA ou Kruskal-Wallis seguido do teste de Tukey ou Dunns para múltiplas comparações.

O tratamento com 2,5 μM alterou a expressão de caspase-3 no grupo infectado com MOI 1 vírus Zika, reduzindo a MFI de 238,5 para 218,5 no grupo infectado e tratado ($p=0,0129$, Kruskal-Wallis; Figura 21a). Já para o grupo infectado com MOI 0,1 e tratado com 2,5 μM de curcumina, não houve alteração na produção de caspase-3 quando comparado com grupo infectado e não tratado. Para o tratamento com 5 μM de curcumina, não houve alteração estatística da expressão da caspase-3, quando comparado com os grupos infectados e não tratados (Kruskal-Wallis, $p=0,3174$; Figura 21b).

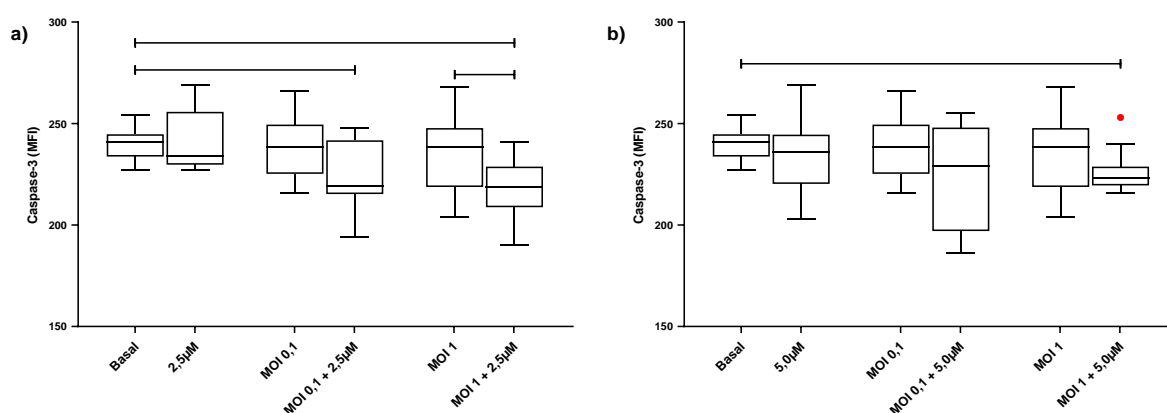


Figura 21: Influência da curcumina na ativação da caspase-3 em cultivo de micróglia BV2 após 24h na presença do vírus Zika. A) O tratamento com a curcumina na concentração 2,5 μM reduziu a expressão de caspase-3 pelas células BV2 na presença de MOI 1 de vírus Zika ($p=0,0405$, teste t), mas não alterou esta expressão pelas células na presença de MOI 0,1 de vírus; B) O tratamento com 5 μM de curcumina não alterou a expressão de Caspase-3 pelas células BV2 na presença de 0,1 e 1 MOI de vírus Zika. Avaliações pelo teste ANOVA ou Kruskal-Wallis seguido do teste de Tukey ou Dunns para múltiplas comparações.

5.5. Influência da curcumina sobre a expressão da LC3 em micróglia durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a influência da infecção com o vírus Zika e do tratamento com a curcumina sobre a autofagia, foi realizada a quantificação da proteína LC3B nas micróglia BV2, utilizando a metodologia descrita no item 4.5.6.

Segundo os resultados, a infecção com o vírus Zika aumentou a expressão da proteína LC3 nas células BV2 tanto na presença de MOI 0,1 do vírus, quanto na presença de MOI 1 do vírus. Em relação ao basal, a MFI aumentou de 133 para 135 e 138, quando as células foram infectadas com MOI 0,1 e 1, respectivamente ($p=0,0278$, ANOVA; Figura 22a). A curcumina nas concentrações 0,31 μM e 0,62 μM também foi capaz de aumentar a expressão de LC3 nas células BV2 tratadas em relação ao estado basal. Nesses grupos, a MFI aumentou de 133 (basal) para 140 quando tratadas com 0,31 μM de curcumina e para 137 quando tratadas com 0,62 μM ($p=0,0011$, ANOVA). Não houve alterações significativas na MFI nas células que receberam o tratamento com 1,25 μM , 2,5 μM e 5 μM de curcumina (Figura 22b). Durante o experimento, também foi acrescentado um grupo controle, realizando o tratamento das células não-infectadas com a pepstatina, um inibidor da autofagia. Porém, não observamos diferença estatística entre o grupo basal (MFI 133) e o grupo tratado com a pepstatina (MFI 130) (Mann-Whitney, $p=0,5641$).

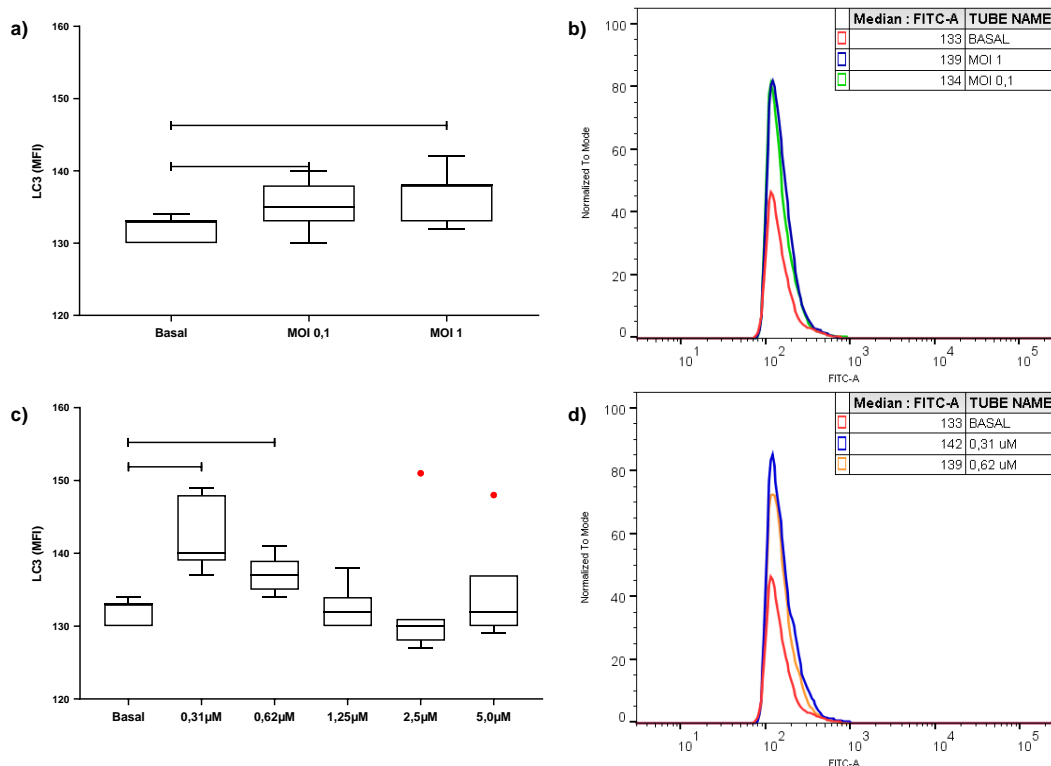


Figura 22: Influência da infecção pelo vírus Zika e do tratamento com a curcumina na expressão de LC3 em cultivo de micróglias BV2 após 24h. A) A infecção pelo vírus Zika aumentou a expressão de LC3 pelas micróglias BV2, no MOI 0,1 de vírus ($p=0,0340$) e no MOI 1 ($p=0,0273$). B) Histograma representativo da marcação para LC3 pelos grupos de células infectadas com MOI 0,1 e 1 do vírus. C) O tratamento com 0,31 μM e 0,62 μM de curcumina aumentou a expressão de LC3 pelas micróglias BV2 ($p=0,0073$ e $p=0,0005$, respectivamente) D) Histograma representativo da marcação para LC3 pelos grupos de células tratadas com 0,31 e 0,62 μM de curcumina. Avaliações pelo teste t ou ANOVA seguido pelo método de Tukey para múltiplas comparações.

Em relação ao tratamento com a curcumina nos grupos de células infectadas com o vírus, observamos que a curcumina não foi capaz de alterar a expressão de LC3 em nenhum dos grupos infectados MOI 0,1 do vírus (Figura 23). Entretanto, as concentrações de 1,25 μM e 5 μM foram capazes de aumentar a expressão da LC3 nos grupos infectados com MOI 1. Segundo os dados, houve o aumento da MFI de 138 no grupo infectado com MOI 1 para 141 no grupo infectado e tratado com 1,25 μM ($p=0,0203$, teste t ; Figura 23c) e aumento para 141 no grupo infectado e tratado com 5 μM de curcumina ($p=0,0303$, teste t ; Figura 23e).

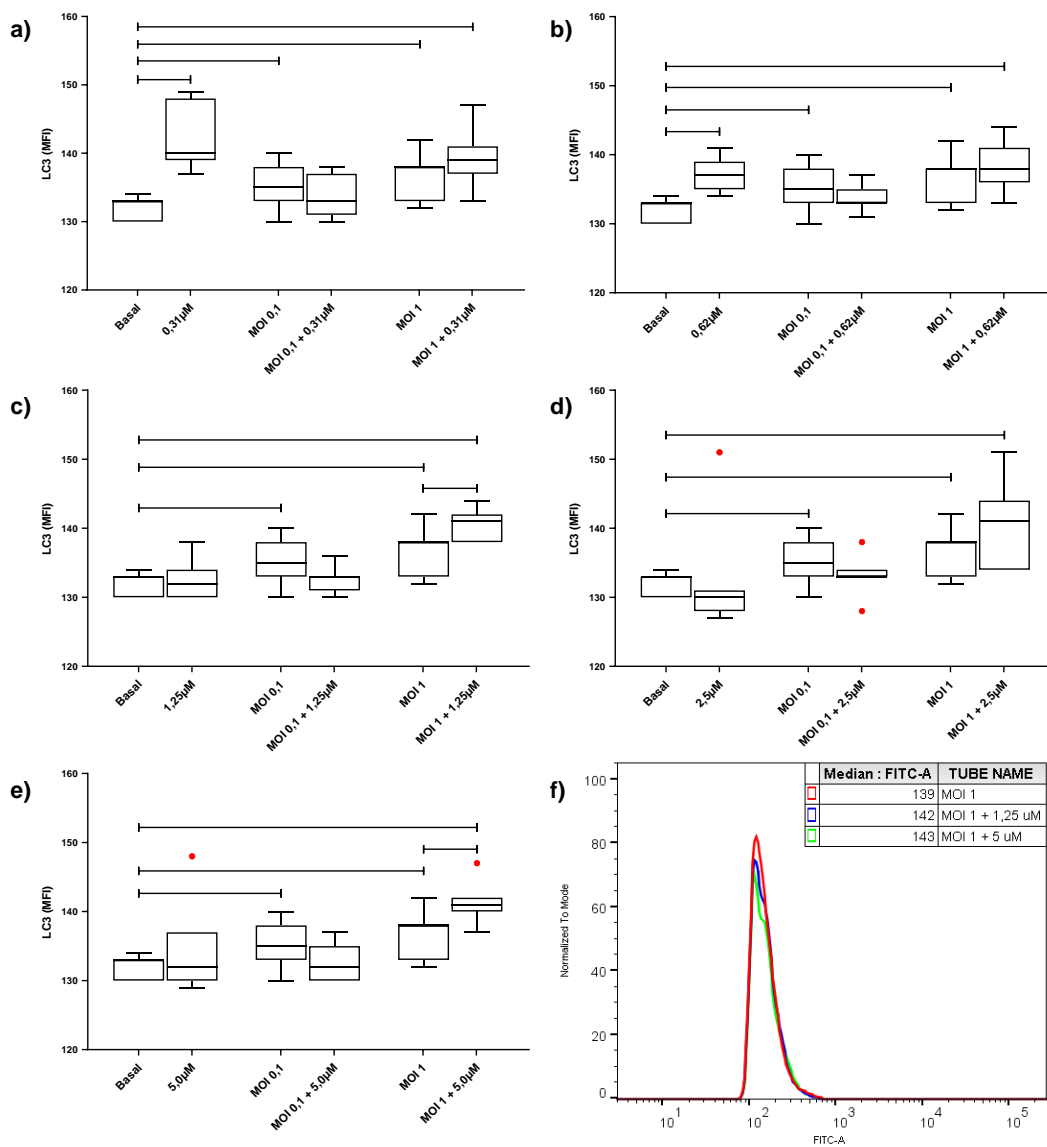


Figura 23: Influência da curcumina na expressão de LC3 em cultivo de micróglia BV2 após 24h na presença do vírus Zika. A) O tratamento com 0,31 μ M de curcumina não alterou a expressão da proteína LC3 pelas células BV2 na presença do vírus Zika; B) O tratamento com 0,62 μ M de curcumina não alterou a expressão de LC3 pelas células BV2 na presença do vírus Zika; C) O tratamento com 1,25 μ M de curcumina não alterou a expressão de LC3 pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 de vírus, mas aumentou a sua expressão pelas células na presença de MOI 1 de vírus; D) O tratamento com 2,5 μ M de curcumina não alterou a expressão da proteína LC3 pelas células BV2 na presença do vírus Zika; E) O tratamento com 5 μ M de curcumina não alterou a expressão de LC3 pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 de vírus, mas aumentou a sua expressão pelas células na presença de MOI 1 de vírus; F) Histograma representativo da marcação para LC3 nos grupos de células infectadas com MOI 1 do vírus e que receberam o tratamento com 1,25 μ M e 5 μ M de curcumina. Avaliações pelo teste ANOVA ($p > 0,001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.6. Influência da curcumina sobre a expressão da mTOR em micróglia durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a influência da infecção com o vírus Zika e do tratamento com a curcumina sobre a expressão da proteína mTOR nas micróglia BV2, foi utilizada a metodologia descrita no item 4.5.6.

Observamos que a infecção com o vírus Zika não alterou a expressão de mTOR nos grupos de células infectadas tanto com MOI 0,1 do vírus, quanto no MOI 1 em relação às células não infectadas (ANOVA, $p=0,6857$; Figura 24a). Também não houve alterações na expressão da mTOR nos grupos de células não-infectadas tratadas com as diferentes concentrações da curcumina (ANOVA, $p=0,0336$; Figura 24b). No decorrer do experimento, também foi acrescentado um grupo controle, realizando o tratamento das células não-infectadas com o PP-242, um inibidor da mTOR. Porém, não observamos diferença estatística entre o grupo basal (MFI 152) e o grupo tratado com a pepstatina (MFI 146) (Kruskal-Wallis, $p=0,6532$).

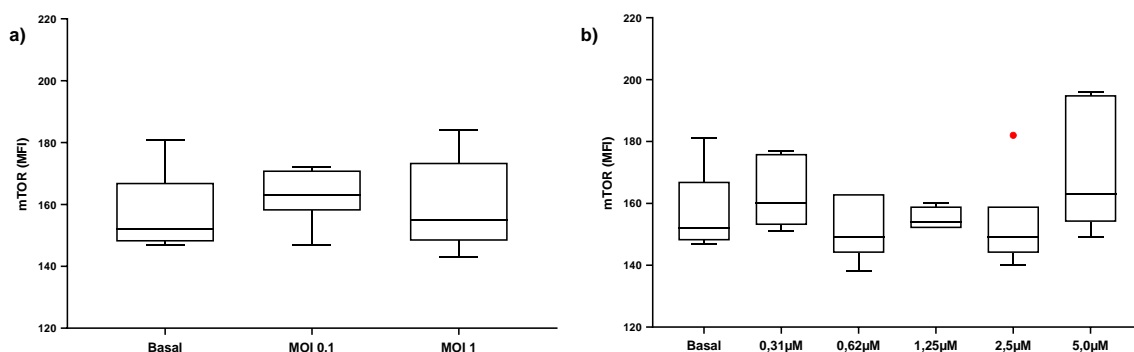


Figura 24: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na expressão de mTOR em cultivo de micróglia BV2 após 24h. A) A infecção pelo vírus Zika não alterou a expressão de mTOR pelas micróglia BV2 nos dois coeficientes de infecção viral; B) O tratamento com a curcumina também não alterou a expressão de mTOR em todas as concentrações do fármaco testadas. Avaliações pelo teste ANOVA com $p>0,05$ seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

Segundo os dados, a curcumina na concentração de 0,31 μM não alterou a expressão de mTOR nos grupos infectados com MOI 0,1 e MOI 1 do vírus em relação às células infectadas não tratadas (ANOVA, $p=0,1122$; Figura 25a). Já quando tratadas com 0,62 μM de curcumina, houve a redução da expressão de mTOR de 155 MFI no grupo das células infectadas com MOI 1 para 139 no grupo de células infectadas com MOI 1 e tratadas ($p=0,0408$, teste t ; Figura 25b). De forma semelhante, o tratamento com 1,25 μM também reduziu a expressão de mTOR no grupo de células infectadas com o MOI 1, diminuindo a MFI de 155 para 144 ($p=0,0259$, teste t ; Figura 25c).

Já os tratamentos de 2,5 μM e 5 μM reduziram a expressão da mTOR nos grupos infectados com MOI 0,1 e MOI 1 do vírus Zika. Para o tratamento com 2,5 μM , houve a redução da MFI de 163 no grupo infectado com MOI 0,1 para 152 no grupo infectado e tratado ($p=0,0292$, teste t) e redução da MFI de 155 no grupo infectado com MOI 1 para 145 no grupo infectado e tratado ($p=0,0328$, teste t), quando infectados com MOI 1 e tratadas (Figura 25d). Para os grupos tratados com 5 μM de curcumina, houve a redução da MFI de 163 no grupo infectado com MOI 0,1 para 153 no grupo infectado e tratado ($p=0,0191$, teste t) e redução da MFI de 155 no grupo infectado com MOI 1 para 145 no grupo infectado e tratado ($p=0,0294$, teste t ; Figura 25e).

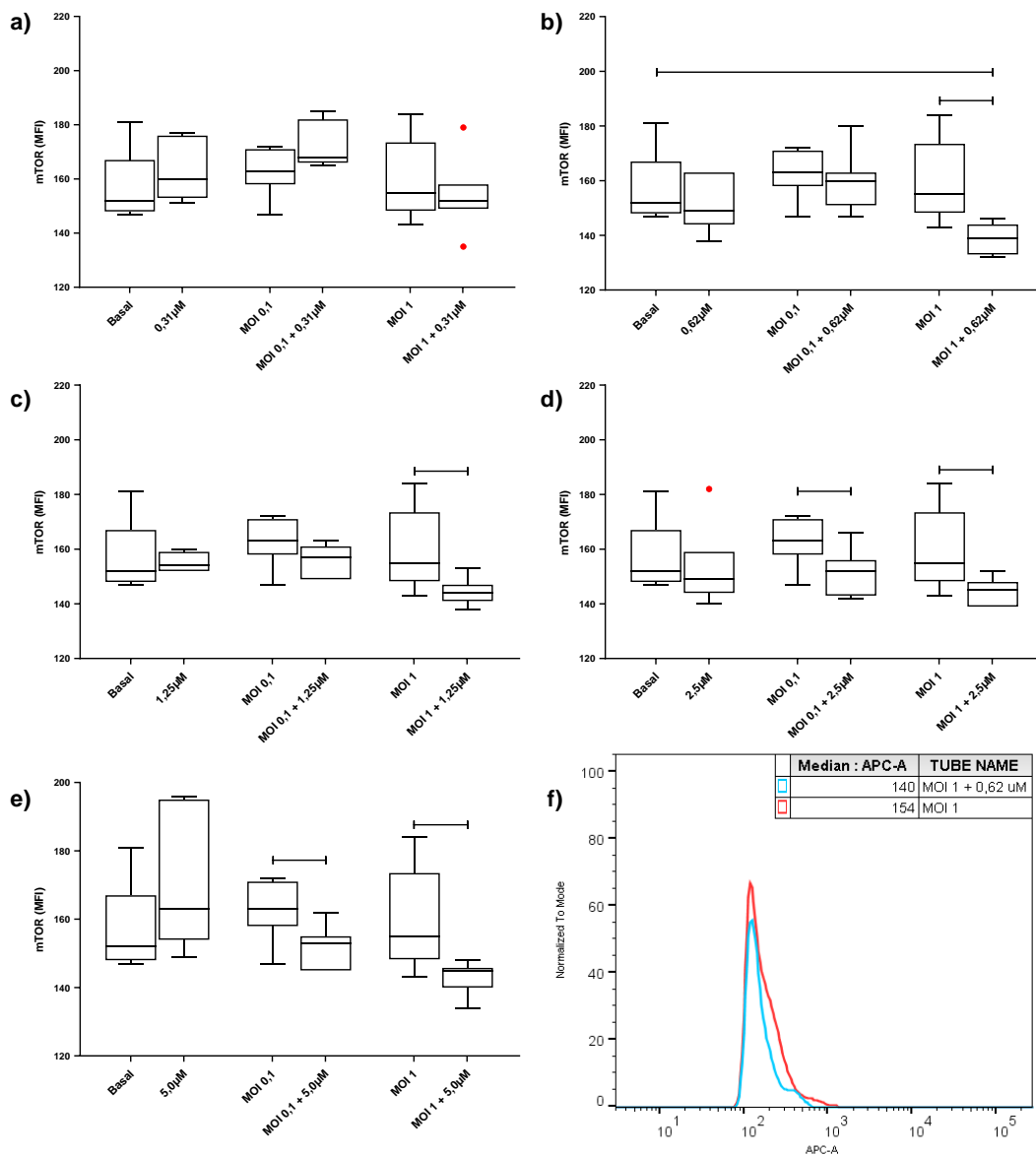


Figura 25: Influência da curcumina na expressão de mTOR em cultivo de micróglias BV2 após 24h na presença do vírus Zika. A) A curcumina a 0,31 μ M não alterou a expressão de mTOR pelas células BV2 na presença do vírus Zika; B) O tratamento com 0,62 μ M de curcumina não alterou a expressão de mTOR pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 de vírus, mas reduziu a sua expressão pelas células na presença de MOI 1 de vírus; C) O tratamento com 1,25 μ M de curcumina não alterou a expressão de mTOR pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 de vírus, mas diminuiu a sua expressão pelas células na presença de MOI 1 de vírus; D) O tratamento com 2,5 μ M de curcumina reduziu a expressão de mTOR pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 de vírus Zika. E) O tratamento com 5 μ M de curcumina reduziu a expressão de mTOR pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus Zika; F) Histograma representativo da marcação para mTOR nos grupos de células infectadas com MOI 1 do vírus que receberam ou não o tratamento com 0,62 μ M de curcumina. Avaliações pelo teste ANOVA ($p > 0,001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.7. Influência da curcumina sobre a quantidade de vírus intracelular

Para avaliar se a curcumina influenciou a quantidade de vírus dentro das micróglias BV2, foi realizada a quantificação da glicoproteína E viral, utilizando a metodologia descrita no item 4.5.6.

Os nossos dados mostraram que 2,61% das micróglias que estavam na presença de MOI 0,1 do vírus Zika apresentaram a glicoproteína E em seu meio intracelular. Já no grupo de células infectadas com MOI 1 do vírus Zika, observamos que 1,81% das micróglias apresentavam a glicoproteína E após 24 horas de infecção (Figura 26).

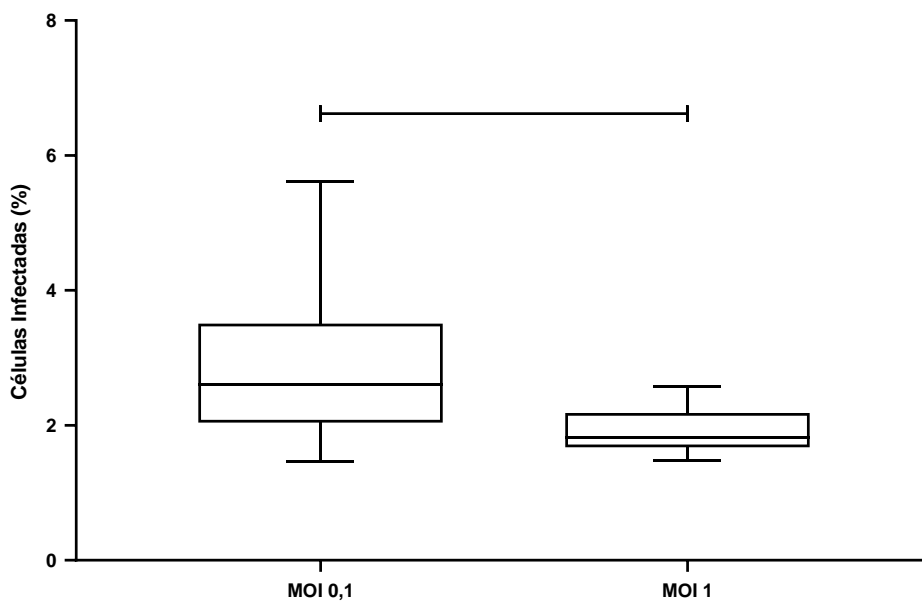


Figura 26: Quantificação das micróglias BV2 infectadas pelo vírus Zika. O número de células infectadas foi maior no grupo de células que estava na presença de MOI 0,1 do vírus (teste t).

Quando realizamos o tratamento das micróglias, observamos que a curcumina nas concentrações 0,31 μM , 0,62 μM e 2,5 μM não alteraram o número de células infectadas pelo vírus. O tratamento com 1,25 μM de

curcumina reduziu o número de células infectadas de 1,81% para 1,62% no grupo infectado com MOI 1 do vírus (teste *t*, $p=0,0444$). Já o tratamento com 5 μM de curcumina também alterou o número de células infectadas com MOI 1 do vírus, aumentando para 2,25% de células infectadas (teste *t*, $p=0,0167$; Figura 27).

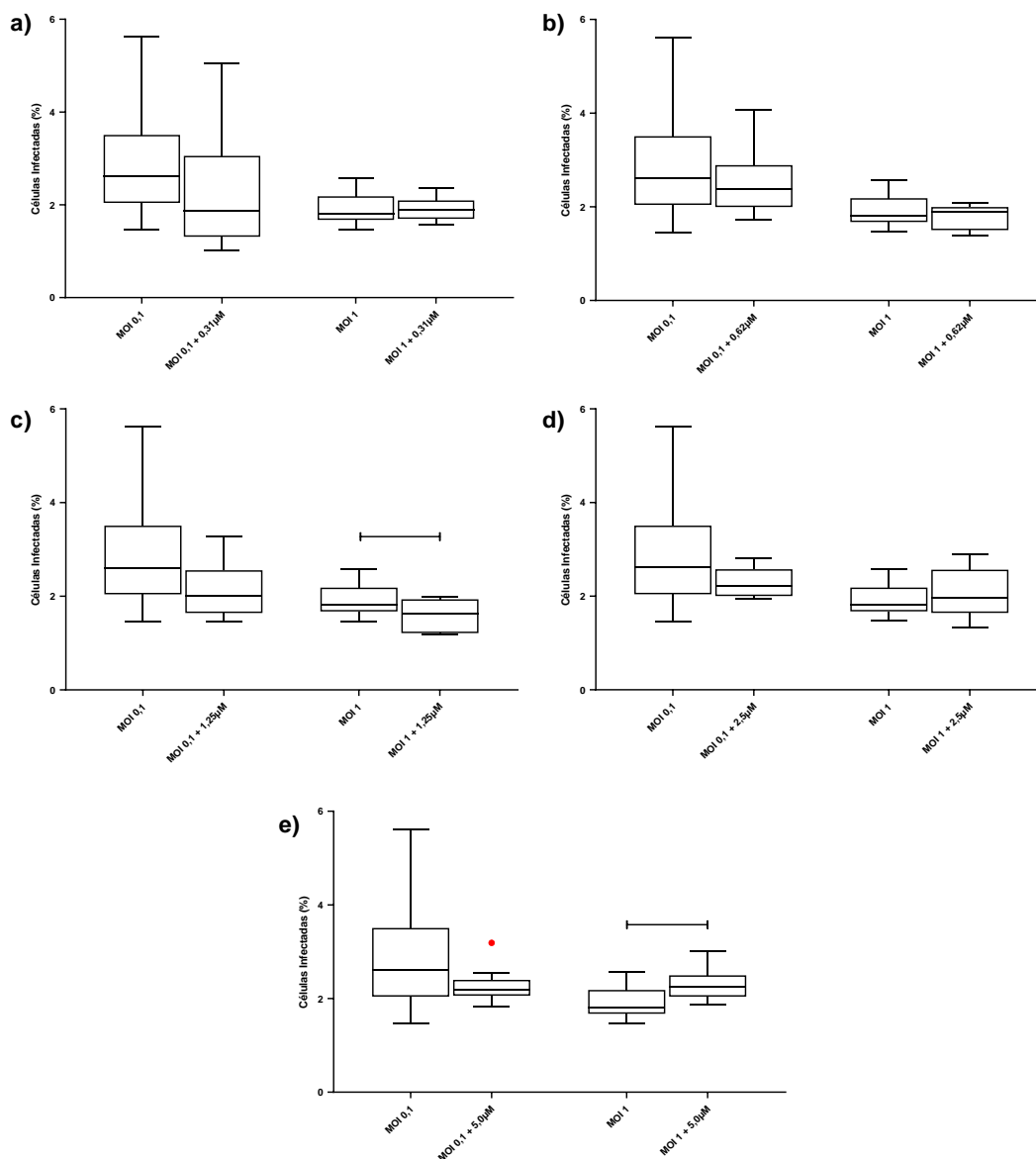


Figura 27: Influência da curcumina sobre a quantidade de células infectadas pelo vírus Zika. A) O tratamento com 0,31 μM de curcumina não alterou o número de células infectadas pelo vírus; B) O tratamento com 0,62 μM de curcumina também não alterou o número de células infectadas; C) O tratamento com 1,25 μM de curcumina reduziu o número de células infectadas quando estavam na presença de MOI 1 do vírus (teste *t*); D) O tratamento com 2,5 μM de curcumina não alterou o número de células infectadas pelo vírus; E) O tratamento

com 5 µM de curcumina aumentou o número de células infectadas quando estavam na presença de MOI 1 do vírus (teste t).

5.8. Influência da curcumina sobre a produção de ERNs sobre as micróglia BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a influência do vírus Zika e do tratamento com a curcumina sobre a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) pelas micróglia BV2, a produção dessa espécie reativa foi quantificada utilizando a metodologia descrita no item 4.5.7.

Segundo os dados, a infecção com o vírus Zika alterou a produção de ERNs pelas células BV2, aumentando a sua produção quando incubada com MOI 0,1 do vírus, mas diminuindo quando incubados com MOI 1. Em relação a produção basal das células não infectadas e não tratadas, observamos que a MFI aumentou de 164 para 174,5 durante a infecção com MOI 0,1 do vírus, mas diminuiu para 159,5 durante a infecção com o MOI 1 (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 28a).

A curcumina em todas as concentrações testadas foi capaz de modular a produção de ERNs sobre as micróglia BV2. A incubação por 24 horas com a curcumina na concentração de 0,31 µM aumentou a MFI de 164 das células não infectadas e não tratadas para 192; para 182,5 quando tratadas com 0,62 µM de curcumina; para 183 quando tratadas com 1,25 µM; para 174 quando incubadas com 2,5 µM de curcumina; e para 174,5, quando tratadas com 5 µM de curcumina (ANOVA, $p < 0,0001$, seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações; Figura 28c).

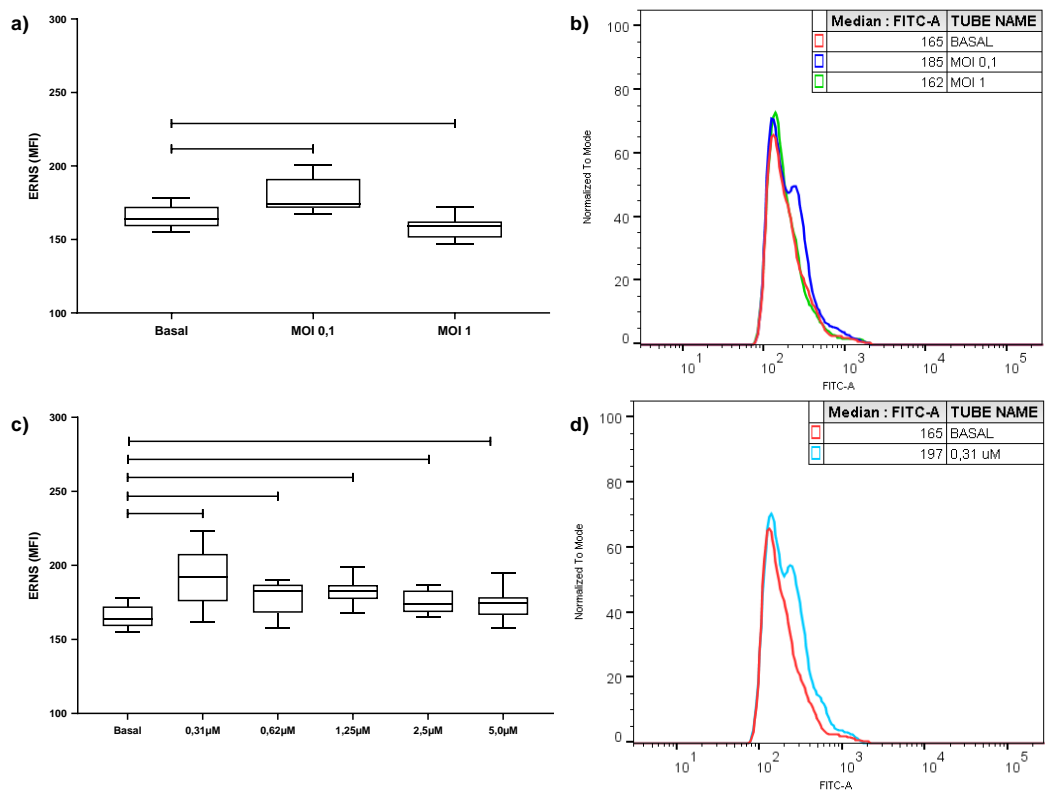


Figura 28: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de ERNs em cultivo de micróglia BV2 após 24h. A) A infecção pelo vírus Zika aumentou a produção de ERNs pelas micróglia BV2 na presença de MOI 0,1 do vírus, mas reduziu a sua produção quando estavam na presença de MOI 1 ($p < 0,0001$); B) Histograma representativo da marcação para ERNs nos grupos basal e infectados com 0,1 e 1 MOI do vírus; C) O tratamento com a curcumina aumentou a produção de ERNs pelas micróglia BV2 ($p < 0,0001$). D) Histograma representativo da marcação para ERNs nos grupos basal e tratados com 0,31 μM de curcumina. Avaliações pelo teste ANOVA ($p > 0,001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

Durante a infecção, a curcumina nas concentrações 0,31 μM , 0,62 μM e 1,25 μM foi capaz de modular a produção das ERNs nos grupos infectados com MOI 1 do vírus Zika. Os dados mostraram que o tratamento com 0,31 μM de curcumina aumentou a expressão de ERNs de 159,5 (MFI) nas células infectadas para 167,5 nas células infectadas e tratadas (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 29a). De forma semelhante, o tratamento com 0,62 μM de curcumina aumentou a MFI para 177,5 nas células infectadas com MOI 1 e tratadas (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 29c). Já o tratamento com 1,25 μM de curcumina

aumentou a MFI para 166,5 nas células infectadas com MOI 1 e tratadas, retornando esta produção para o nível basal (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 29e).

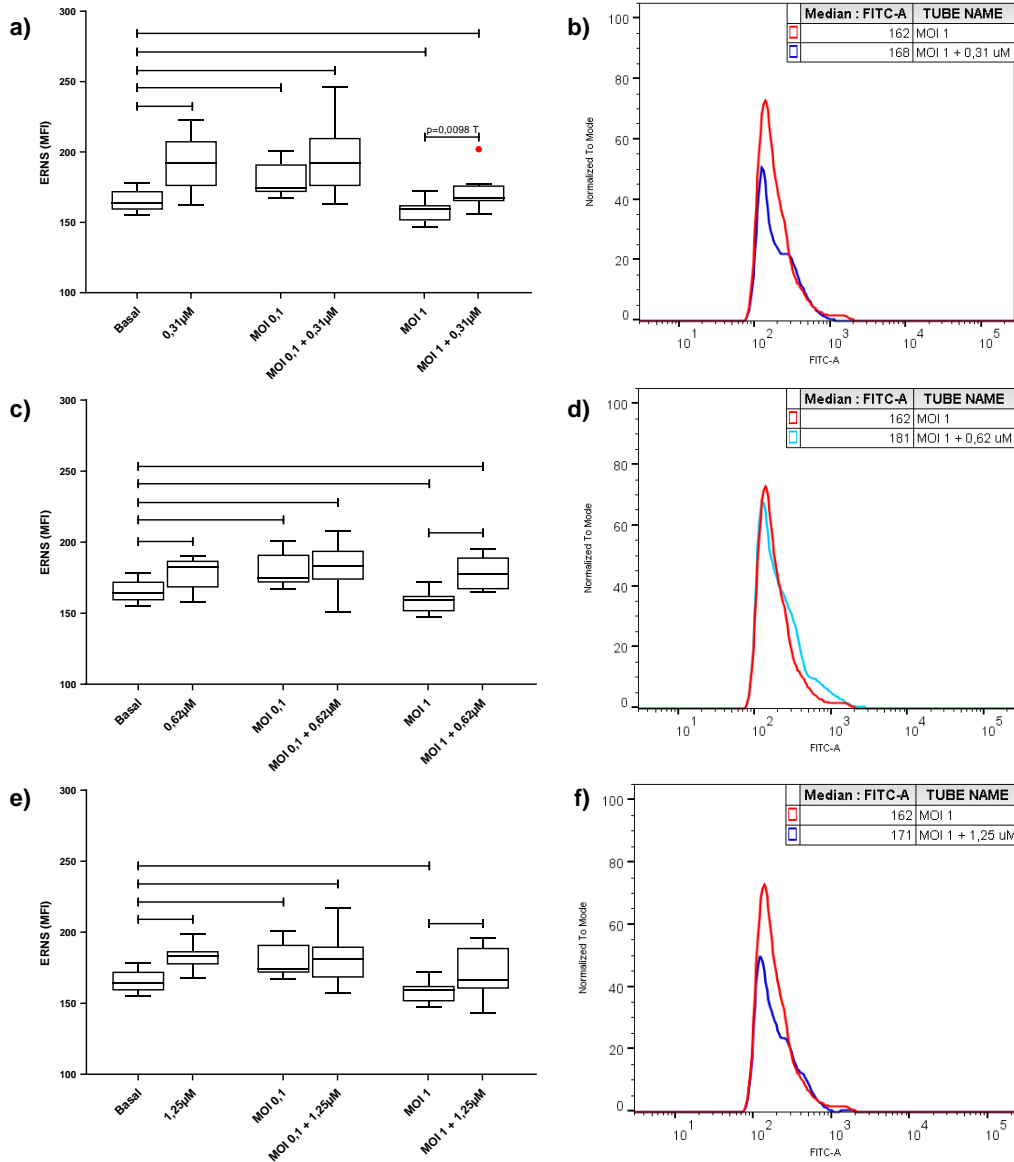


Figura 29: Influência da curcumina na produção de ERNs em cultivo de micróglia BV2 após 24h na presença do vírus Zika. A) O tratamento com 0,31 µM de curcumina não alterou a produção de ERNs pelas micróglia BV2 na presença de MOI 0,1 de vírus, mas aumentou a sua produção nas células na presença de MOI 1 de vírus ($p < 0,0001$); B) Histograma representativo da marcação para ERNs pelos grupos de células na presença com MOI 1 de vírus, com ou sem o tratamento com 0,31 µM de curcumina. C) O tratamento com 0,62 µM de curcumina não alterou a produção de ERNs pelas micróglia que estavam na presença de MOI 0,1 de vírus, mas aumentaram a produção pelo grupo que estava na presença de MOI 1 de vírus ($p < 0,0001$). D) Histograma representativo da marcação para ERNs pelos grupos de células na presença com MOI 1 de vírus, com ou sem o tratamento com 0,62 µM de curcumina.

E) O tratamento com 1,25 μM de curcumina não alterou a produção de EROs pelas micróglia que estavam na presença de MOI 0,1 de vírus, mas aumentaram a sua produção pelo grupo que estava na presença de MOI 1 de vírus ($p < 0,0001$); F) Histograma representativo da marcação para ERNs pelos grupos de células na presença com MOI 1 de vírus, com ou sem o tratamento com 1,25 μM de curcumina. Avaliações pelo teste ANOVA ($p > 0,0001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

Já as concentrações 2,5 μM (Figura 30a) e 5 μM (Figura 30b) não alteraram a produção de ERNs pelas micróglia BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 de vírus Zika (ANOVA, $p < 0,0001$ seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações)

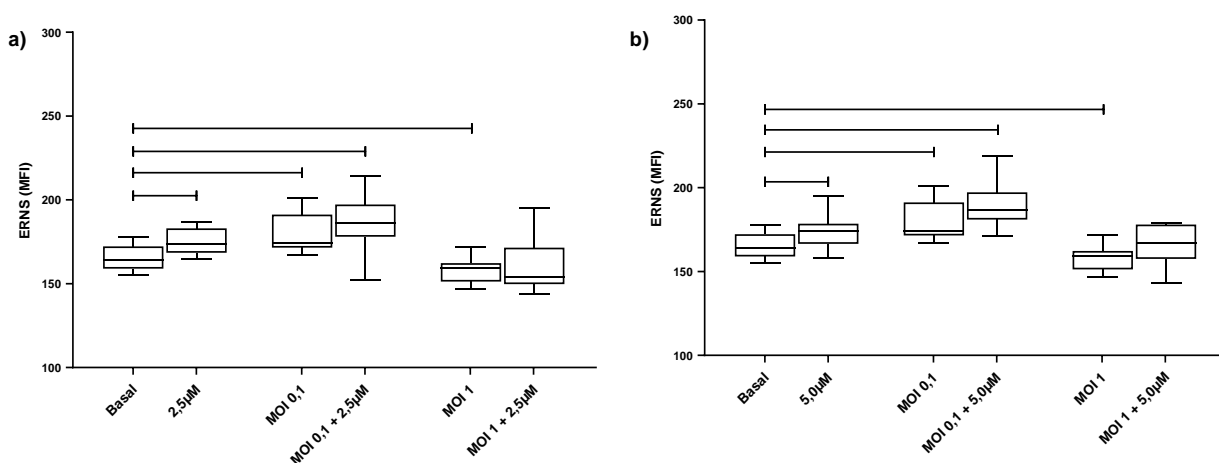


Figura 30: Influência da curcumina na produção de ERNs em cultivo de micróglia BV2 após 24h na presença do vírus Zika. A) A curcumina na concentração 2,5 μM não foi capaz de alterar a produção de ERNs pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 de vírus Zika; B) A curcumina na concentração 5 μM não foi capaz de alterar a produção de ERNs pelas micróglia BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 de vírus Zika. Avaliações pelo teste ANOVA ($p > 0,001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.9. Influência da curcumina sobre a produção de EROS sobre as micróglia BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a influência do vírus Zika e do tratamento com a curcumina sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas micróglia BV2, a produção dessa espécie reativa foi quantificada utilizando a metodologia descrita no item 4.5.8.

Segundo os dados, a infecção com o vírus Zika alterou a produção de EROs pelas células BV2 nas duas condições estudadas, aumentando a sua produção tanto no grupo de células infectadas com MOI 0,1, quanto no grupo infectado com 1 MOI. Observamos que a MFI aumentou a produção basal de 189 para 251,5 no grupo infectado com MOI 0,1 e aumentou para 251,0 no grupo infectado com MOI 1 (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 31a).

O tratamento com a curcumina também modificou a produção de EROs pelas micróglias BV2. Segundo os resultados, a produção basal de EROS passou de 189 (MFI) para 269 nas células tratadas com 0,31 μM de curcumina; aumentou para 273,5 com o tratamento de 0,62 μM ; aumentou para 269 com o tratamento a 1,25 μM ; para 241, com o tratamento de 2,5 μM ; e para 244,5, quando as células foram tratadas com 5 μM de curcumina (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 31c).

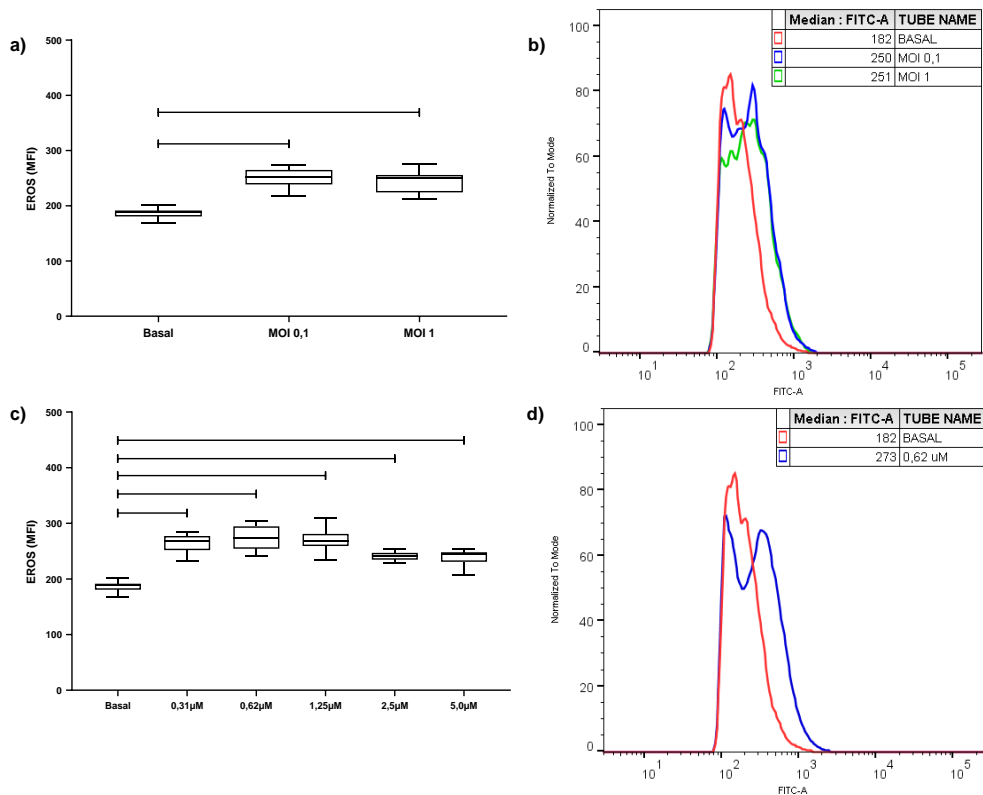


Figura 31: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de EROs em cultivo de micróglias BV2 após 24h. A) A infecção pelo vírus Zika aumentou a produção de

EROs pelas micróglia BV2, quando estas estavam na presença de MOI 0,1 do vírus e na presença de MOI 1 ($p < 0,0001$); B) Histograma representativo da marcação para EROs nos grupos de células basais e infectadas com 0,1 e 1 MOI de vírus; C) O tratamento com a curcumina aumentou a produção de EROs pelas micróglia BV2, quando estas foram expostas à todas as concentrações de curcumina avaliadas ($p < 0,0001$, ANOVA); D) Histograma representativo da marcação para EROs nos grupos de células no estado basal e tratadas com 0,62 μM de curcumina. Avaliações pelo teste ANOVA ($p > 0,001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

Durante a infecção, apenas o tratamento com 0,31 μM foi capaz de alterar a produção de EROs pelo grupo de células infectadas com MOI 0,1 do vírus, reduzindo a MFI de 251,5 no grupo de células infectadas e não tratadas para 230 no grupo infectado tratado (ANOVA, $p < 0,0001$). Em relação ao tratamento do grupo de células infectadas com MOI 1, a curcumina 0,31 μM aumentou a produção basal de EROs das micróglia BV2 de 251 para 307 nas células tratadas (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 32).

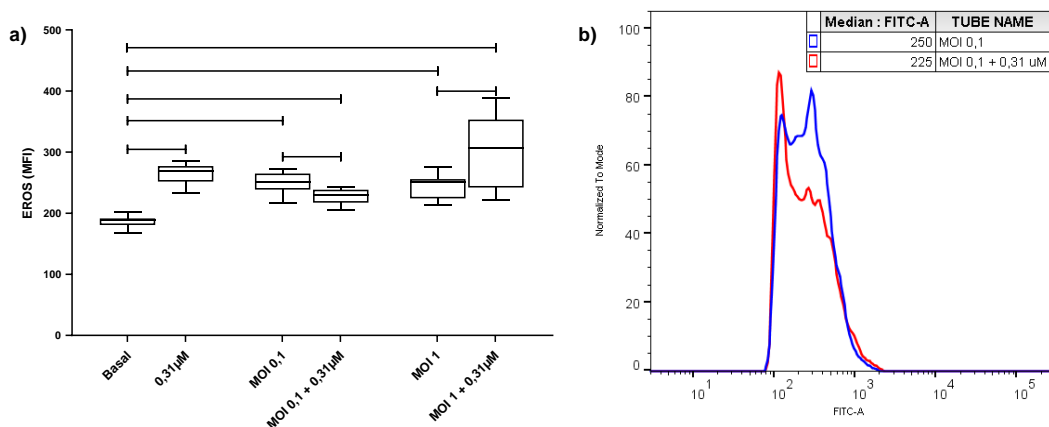


Figura 32: Influência da curcumina na concentração 0,31 μM na produção de EROs em cultivos de micróglia BV2 na presença do vírus Zika após 24h. A) A curcumina a 0,31 μM foi capaz de reduzir a produção de EROs pelas células BV2 na presença de 0,1 MOI do vírus Zika, mas aumentou na presença de MOI 1 ($p < 0,0001$). B) Histograma representativo da marcação para EROs nos grupos de células na presença de MOI 0,1 de vírus Zika, que receberam ou não o tratamento com a curcumina a 0,31 μM . Avaliações pelo teste ANOVA ($p > 0,001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

Já o tratamento com 0,62 μM de curcumina alterou a produção de EROs apenas no grupo de células infectadas com MOI 1 do vírus Zika, com aumento

da MFI de 251 no grupo infectado para 258,5 no grupo infectado e tratado ($p=0,0479$, teste t , Figura 33a). De forma semelhante, o tratamento com as concentrações 1,25 μM (371), 2,5 μM (305) e 5 μM (296,5) também aumentou a produção das espécies reativas de oxigênio apenas nos grupos infectados com MOI 1 (ANOVA, $p<0,0001$; Figura 33).

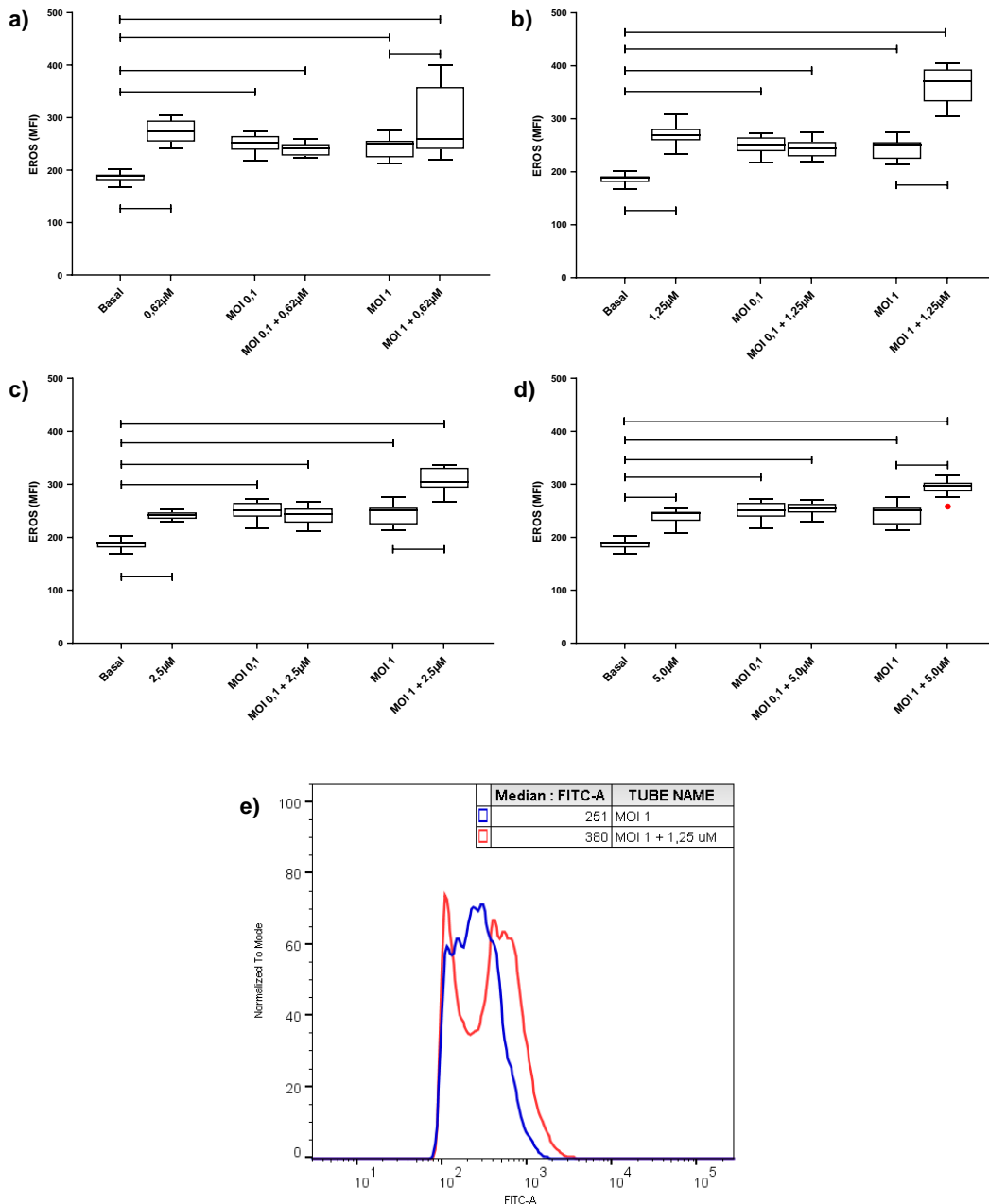


Figura 33: Influência da curcumina na produção de EROs em cultivos de micróglia BV2 na presença do vírus Zika após 24h. A) O tratamento com 0,62 μM de curcumina não alterou a

produção de EROs pelas micróglia que estavam na presença de MOI 0,1 do vírus, mas aumentou a sua produção pelo grupo que estava na presença de MOI 1 ($p=0,0479$); B) O tratamento com 1,25 μM de curcumina não alterou a produção de EROs pelas micróglia que estavam na presença de MOI 0,1 do vírus, mas aumentaram a sua produção pelo grupo que estava na presença de MOI 1 ($p<0,0001$); C) O tratamento com 2,5 μM de curcumina não alterou a produção de EROs pelas micróglia que estavam na presença de MOI 0,1 do vírus, mas aumentaram a sua produção pelo grupo que estava na presença de MOI 1 ($p<0,0001$); D) O tratamento com 5 μM de curcumina não alterou a produção de EROs pelas micróglia que estavam na presença de MOI 0,1 do vírus, mas aumentaram a sua produção pelo grupo que estava na presença de MOI 1 ($p<0,0001$); E) Histograma representativo da marcação para EROs nos grupos de células na presença de MOI 1 de vírus Zika, que receberam ou não o tratamento com a curcumina a 1,25 μM ; Avaliações pelo teste ANOVA ($p>0,001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.10. Influência da curcumina sobre a produção de corpúsculos lipídicos nas micróglia BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a influência do vírus Zika e do tratamento com a curcumina sobre a produção de corpúsculos lipídicos (CL) pelas micróglia BV2, foi utilizada a metodologia descrita no item 4.5.9.

Segundos os resultados, a infecção com o vírus Zika aumentou a produção de corpos lipídicos pelas micróglia BV2 apenas quando estas foram infectadas com MOI 0,1 do vírus (156,5) em relação às células não infectadas e não tratadas (141). Não houve alteração na produção de CL na infecção com MOI 1 do vírus (Teste Kruskal-Wallis, $p=0,0405$; Figura 34a).

Por outro lado, o tratamento com a curcumina aumentou a produção dos corpúsculos lipídicos pelas micróglia em todas as concentrações avaliadas em relação à produção basal (MFI de 141). Os resultados foram 247,5 no tratamento com 0,31 μM de curcumina; 228 no tratamento com 0,62 μM ; 220 no tratamento com 1,25 μM ; 210 com 2,5 μM ; e 194 com 5 μM (Teste Kruskal-Wallis, $p<0,0001$; Figura 34b).

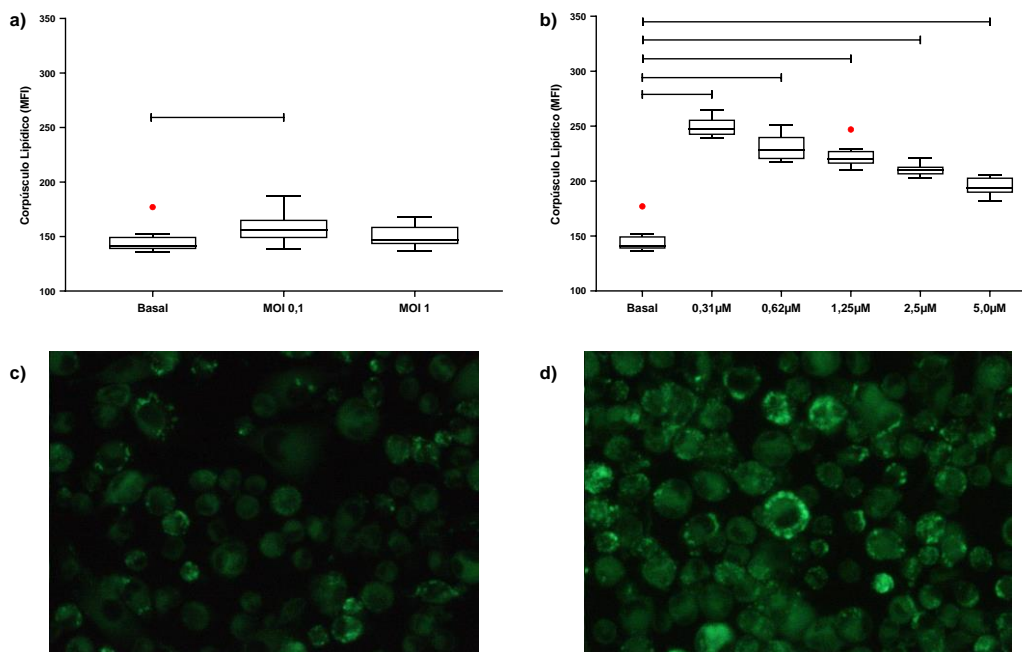


Figura 34: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de corpúsculos lipídicos em cultivo de micróglia BV2 após 24h. A) A infecção pelo vírus Zika aumentou a produção de corpos lipídicos pelas micróglia BV2 infectadas com MOI 0,1 ($p=0,0405$); B) O tratamento com a curcumina aumentou a produção de CL nas micróglia BV2 em todas as concentrações de curcumina ($p<0,0001$); C) Produção de corpos lipídicos pelas micróglia BV2 no estado basal; D) Produção de corpos lipídicos pelas micróglia BV2 infectadas com o MOI 0,1. Foto obtida por microscopia de fluorescência com aumento de 40x. A coloração verde representa a marcação pela sonda Bodipy, indicando a presença de corpos lipídicos. Avaliações pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações.

Durante a infecção, a curcumina foi capaz de aumentar a produção de corpúsculos lipídicos nas células BV2 infectadas com MOI 0,1 (156,5) e MOI 1 (147) do vírus em relação ao basal (141). Isso se repetiu para todas as concentrações da curcumina testadas (Kruskal-Wallis, $p<0,0001$; Figura 35). Na concentração de 0,31 μM de curcumina, houve o aumento da produção de corpúsculos lipídicos de 156,5 para 232,5 no grupo de células infectadas com MOI 0,1 do vírus e aumento de 147 para 225,5 no grupo infectado com 1 MOI. De forma semelhante, o tratamento com 0,62 μM aumentou a MFI de 156,5 para 223 no grupo infectado com MOI 0,1 e de 147 para 200,5 no grupo infectado com 1 MOI de vírus. No grupo tratado com 1,25 μM de curcumina, observamos o aumento da MFI de 156,5 para 203 no grupo infectado com MOI 0,1 e de 147 para 190 no grupo infectado com 1 MOI de vírus. O

tratamento com 2,5 μM também aumentou o MFI em ambas as situações, com aumento da expressão para 192,5 no grupo infectado com MOI 0,1 e para 168,5 no grupo infectado com MOI 1. Por fim, houve o aumento da MFI de 156,5 para 173 no grupo de células infectadas com MOI 0,1 e aumento de 147 para 159,5 no grupo infectado com MOI 1 de vírus.

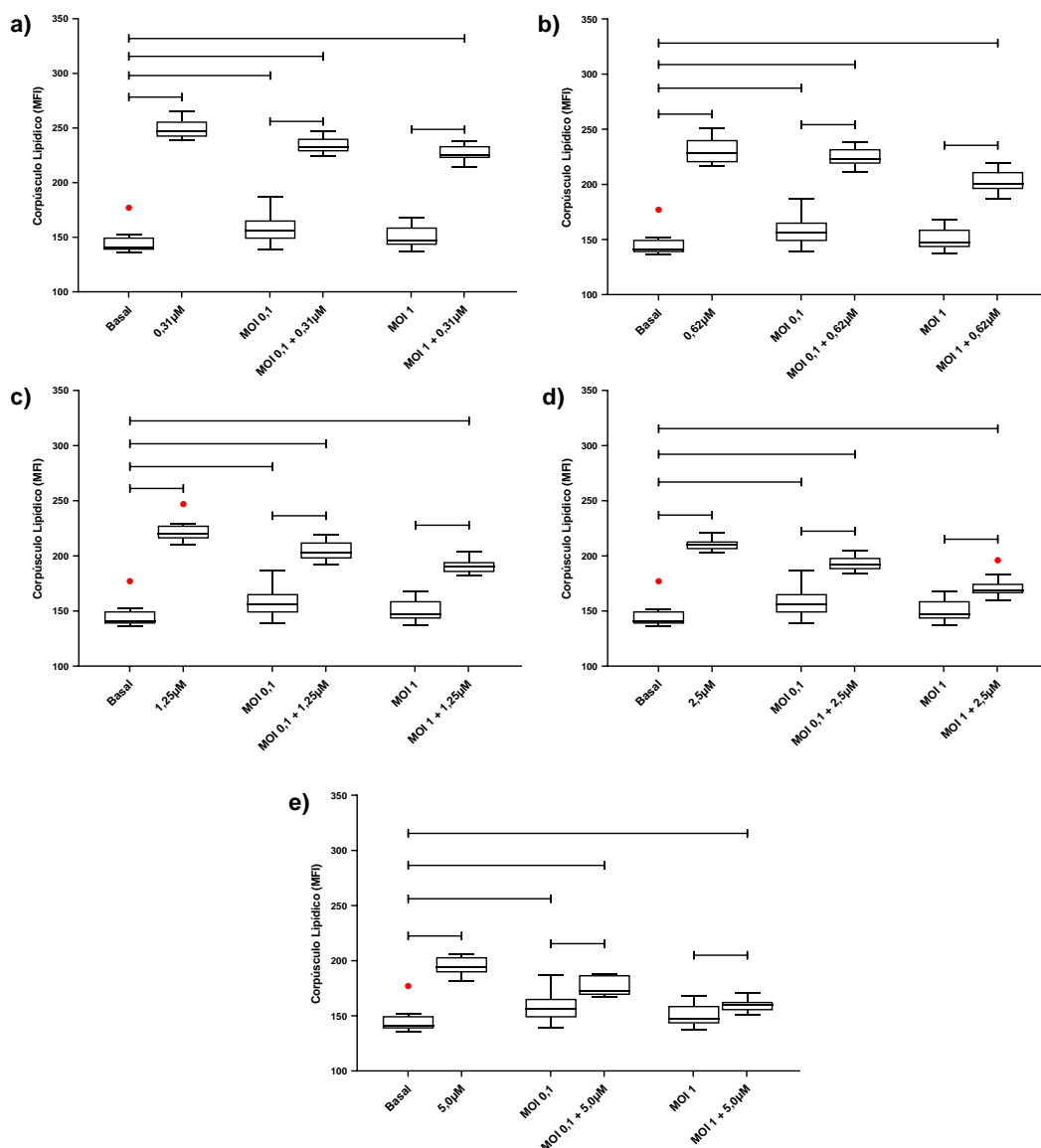


Figura 35: *Influência da curcumina na produção de corpúsculos lipídicos em cultivo de micróglia BV2 na presença do vírus Zika após 24h. A) A curcumina na concentração 0,31 μM aumentou a produção de CL pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus Zika ($p < 0,0001$); B) A curcumina na concentração 0,62 μM aumentou a produção de CL pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus ($p < 0,0001$); C) A curcumina na concentração 1,25 μM aumentou a produção de CL pelas células BV2 na presença de MOI*

0,1 e MOI 1 do vírus ($p < 0,0001$); D) A curcumina na concentração 2,5 μM aumentou a produção de CL pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus Zika ($p < 0,0001$); E) A curcumina na concentração 5 μM aumentou a produção de CL pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus Zika ($p < 0,0001$). Avaliações realizadas pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$) seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações

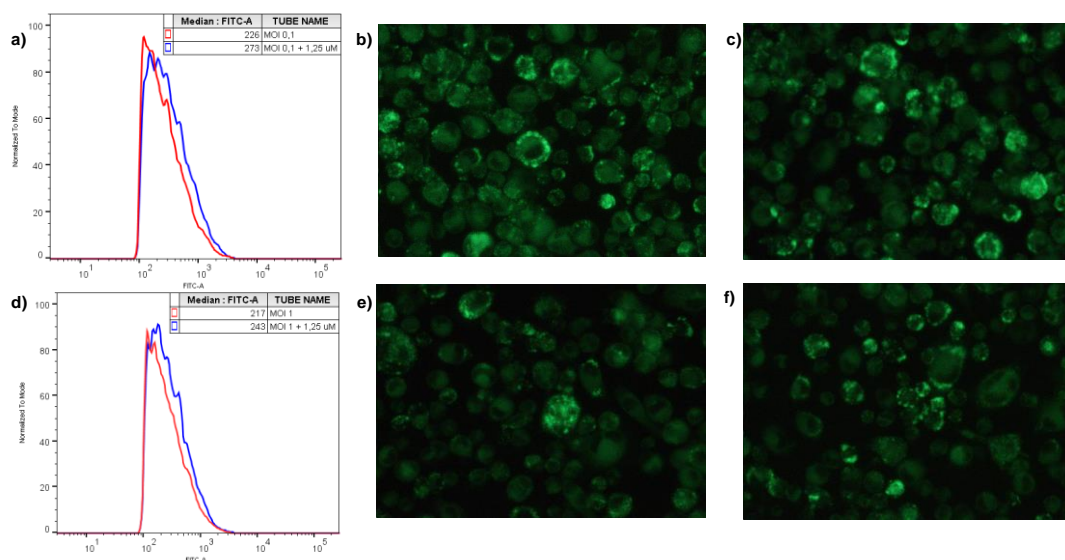


Figura 36: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de corpúsculos lipídicos em cultivo de micróglia BV2 após 24h. A) Histograma representativo da marcação para corpos lipídicos nos grupos de células na presença de MOI 0,1 de vírus Zika, que receberam ou não o tratamento com a curcumina a 1,25 μM . B) Produção de corpos lipídicos pelas micróglia BV2 infectadas com MOI 0,1 do vírus Zika. C) Produção de corpos lipídicos pelas micróglia BV2 infectadas com MOI 0,1 e tratadas com 1,25 μM de curcumina. D) Histograma representativo da marcação para corpos lipídicos pelos grupos de células na presença de MOI 1 de vírus, que receberam ou não o tratamento com curcumina a 1,25 μM . E) Produção de corpos lipídicos pelas micróglia BV2 infectadas com MOI 1 do vírus. F) Produção de corpos lipídicos pelas micróglia BV2 infectadas com MOI 1 do vírus e tratadas com 1,25 μM de curcumina. Fotos obtidas por microscopia de fluorescência com aumento de 40x. A coloração verde representa a marcação pela sonda Bodipy, indicando a presença de corpos lipídicos.

5.11. Avaliação do papel da curcumina sobre a produção de IL-2 em micróglia BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a resposta das micróglia BV2 frente à infecção com o vírus Zika e o papel da curcumina durante a infecção, foi realizado a quantificação

da IL-2 no sobrenadante dos cultivos de micróglias BV2, utilizando a metodologia descrita no item 4.5.10.

Os resultados obtidos mostraram que a infecção com o vírus Zika não alterou a produção de IL-2 nas micróglias BV2, tanto na infecção com MOI 0,1 do vírus (9,61 pg/mL), quanto na infecção com MOI 1 (9,63 pg/mL) em relação à produção basal (9,41 pg/mL) (ANOVA, $p=0,1632$; Figura 37a). Já o tratamento com a curcumina alterou a produção da IL-2 apenas na concentração de 5 μM , com a redução da produção desta citocina de 9,41 pg/mL (basal) para 9,09 pg/mL (Teste t , $p=0,0018$; Figura 37b).

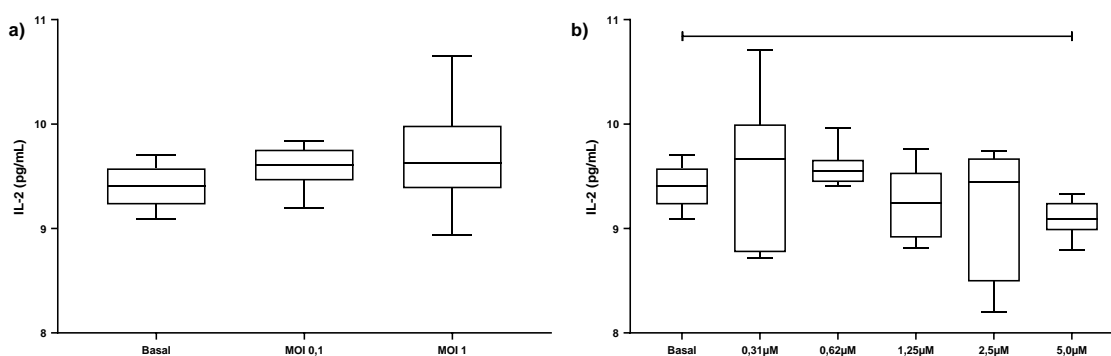


Figura 37: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IL-2 em cultivos de micróglias BV2 após 24h. A) Não houve alteração na produção de IL-2 pelas células BV2 infectadas pelo de MOI 0,1 ou MOI 1 do vírus Zika ($p=0,1632$). B) A curcumina na concentração 5 μM foi capaz de reduzir a produção basal de IL-2 ($p=0,0018$). Avaliações realizadas pelo teste ANOVA ($p=0,0018$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

Durante a infecção, a curcumina na concentração de 0,31 μM não alterou a produção da IL-2 das micróglias BV2 frente aos estímulos com vírus Zika com MOI 0,1 ou MOI 1 (ANOVA, $p=0,5571$; Figura 38a). De forma semelhante, a curcumina na concentração de 1,25 μM também não influenciou a produção de IL-2 pelas micróglias BV2 frente a ambos os estímulos (ANOVA, $p=0,1173$; Figura 38b). Já o grupo que recebeu o tratamento com 0,62 μM de curcumina apresentou um aumento na produção da IL-2 apenas quando infectada com MOI 0,1 de vírus, aumentando a produção de 9,61 pg/mL (células infectadas) para 9,78 pg/mL nas células infectadas e tratadas (ANOVA, $p=0,0144$; Figura

38c). Os tratamentos com 2,5 μM e 5 μM de curcumina diminuíram a produção de IL-2 para 9,11 pg/mL e para 9,06 pg/mL, respectivamente nas células tratadas e infectadas com MOI 0,1 e 1, em relação à produção das células infectadas não tratadas (MOI 0,1 9,61 e 9,63 pg/mL) (ANOVA, $p=0,0007$; Figura 38d). O tratamento com 5 μM de curcumina reduziu a produção de IL-2 pelas células infectadas com o vírus no MOI 0,1 de 9,61 pg/mL para 9,145 pg/mL e das células infectadas com o vírus no MOI 1 de 9,63 pg/mL para 8,975 pg/mL de IL-2 (ANOVA, $p<0.0001$; Figura 38e).

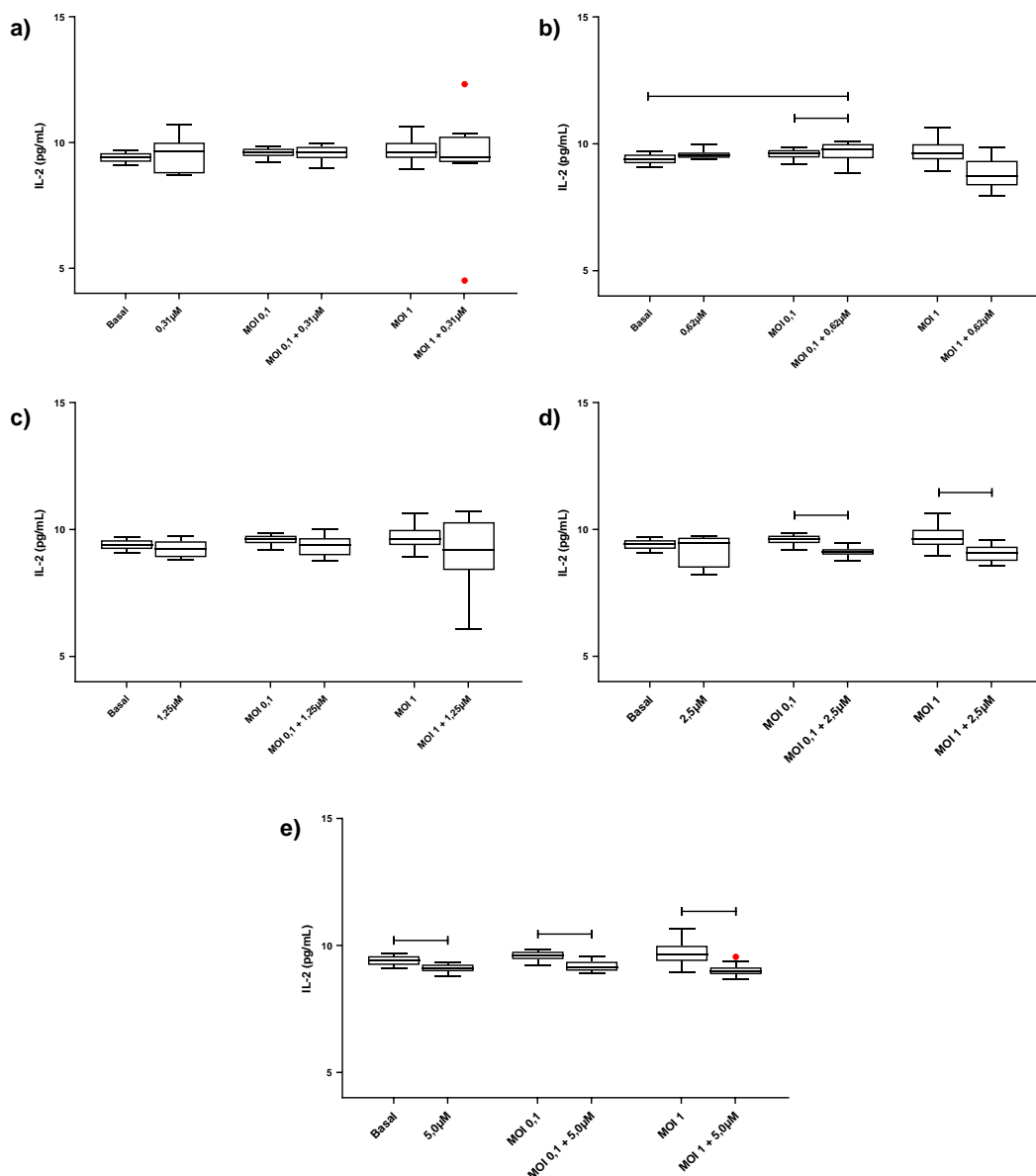


Figura 38: Influência da curcumina na produção de IL-2 em cultivo de micróglia BV2 na presença do vírus Zika após 24h. A) O tratamento com curcumina na concentração 0,31 μM não alterou a produção de IL-2 pelas células BV2 durante a infecção com o vírus Zika ($p=0,5571$); B) O tratamento com 0,62 μM de curcumina aumentou a produção de IL-2 pelo grupo de células que estava na presença de MOI 0,1 de vírus, sem alterar a produção desta citocina pelas células que estava na presença de MOI 1 de vírus ($p=0,0144$); C) O tratamento com 1,25 μM de curcumina não alterou a produção de IL-2 pelas células BV2 durante a infecção com o vírus Zika ($p=0,1173$); D) O tratamento com 2,5 μM de curcumina reduziu a produção de IL-2 pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus ($p=0,0007$); E) O tratamento com 5 μM de curcumina reduziu a produção de IL-2 pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus Zika ($p<0,0001$). Avaliações pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações.

5.12. Avaliação do papel da curcumina sobre a produção de IL-4 em micróglias BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a resposta das micróglias BV2 frente à infecção com o vírus Zika e o papel da curcumina durante a infecção, foi realizado a quantificação da IL-4 no sobrenadante dos cultivos de micróglias BV2, conforme a metodologia descrita no item 4.5.10.

Os resultados obtidos mostram que a infecção com o vírus Zika não modificou a produção de IL-4 pelas micróglias BV2 (9,35 pg/mL), tanto na infecção com o MOI 0,1 (9,51 pg/mL), quanto na infecção com o MOI 1 (9,27 pg/mL) (ANOVA, $p=0,6873$; Figura 39a). Já o tratamento com a curcumina alterou a produção de IL-4 nas micróglias BV2 apenas na concentração de 1,25 μM , com diminuição da produção de IL-4 de 9,35 pg/mL (basal) para 9,01 pg/mL (Teste t , $p=0,0195$; Figura 39b).

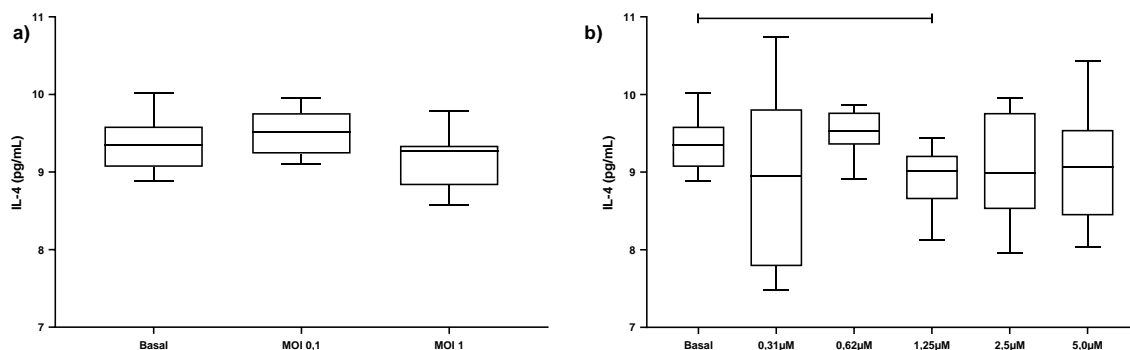


Figura 39: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IL-4 em cultivos de micróglias BV2 após 24h. A) Não houve alteração na produção de IL-4 pelas células BV2 quando estas estavam na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus Zika ($p=0,6873$); B) A curcumina na concentração 1,25 μM reduziu a produção basal de IL-4 pelas micróglias BV2 ($p=0,0196$, teste t). Avaliações realizadas pelo teste ANOVA ($p=0,0840$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

Durante a infecção, a curcumina na concentração de 0,31 μM não alterou a produção de IL-4 pelas células BV2, frente aos estímulos com o vírus Zika com MOI 0,1 ou MOI 1 (ANOVA, $p=0,1101$; Figura 40a). De forma semelhante,

a curcumina a 0,62 μM também não interferiu na produção desta citocina pelas células BV2 em ambos os estímulos (ANOVA, $p=0,1919$; Figura 40b). Já o tratamento com a curcumina a 1,25 μM foi capaz de reduzir a produção de IL-4 pelas micróglia BV2 durante a infecção com MOI 1 (9,27 pg/mL) para 8,30 pg/mL (ANOVA, $p<0,0001$) (ANOVA, $p<0,0001$; Figura 40c). O tratamento com a curcumina a 2,5 μM também não alterou a produção de IL-4 pelas células BV2 (ANOVA, $p=0,2825$; Figura 40d) e o tratamento com 5 μM de curcumina alterou a produção das células infectadas com o MOI 0,1 (9,51 pg/mL) para 8,945 pg/mL (ANOVA, $p=0,0421$; Figura 40e).

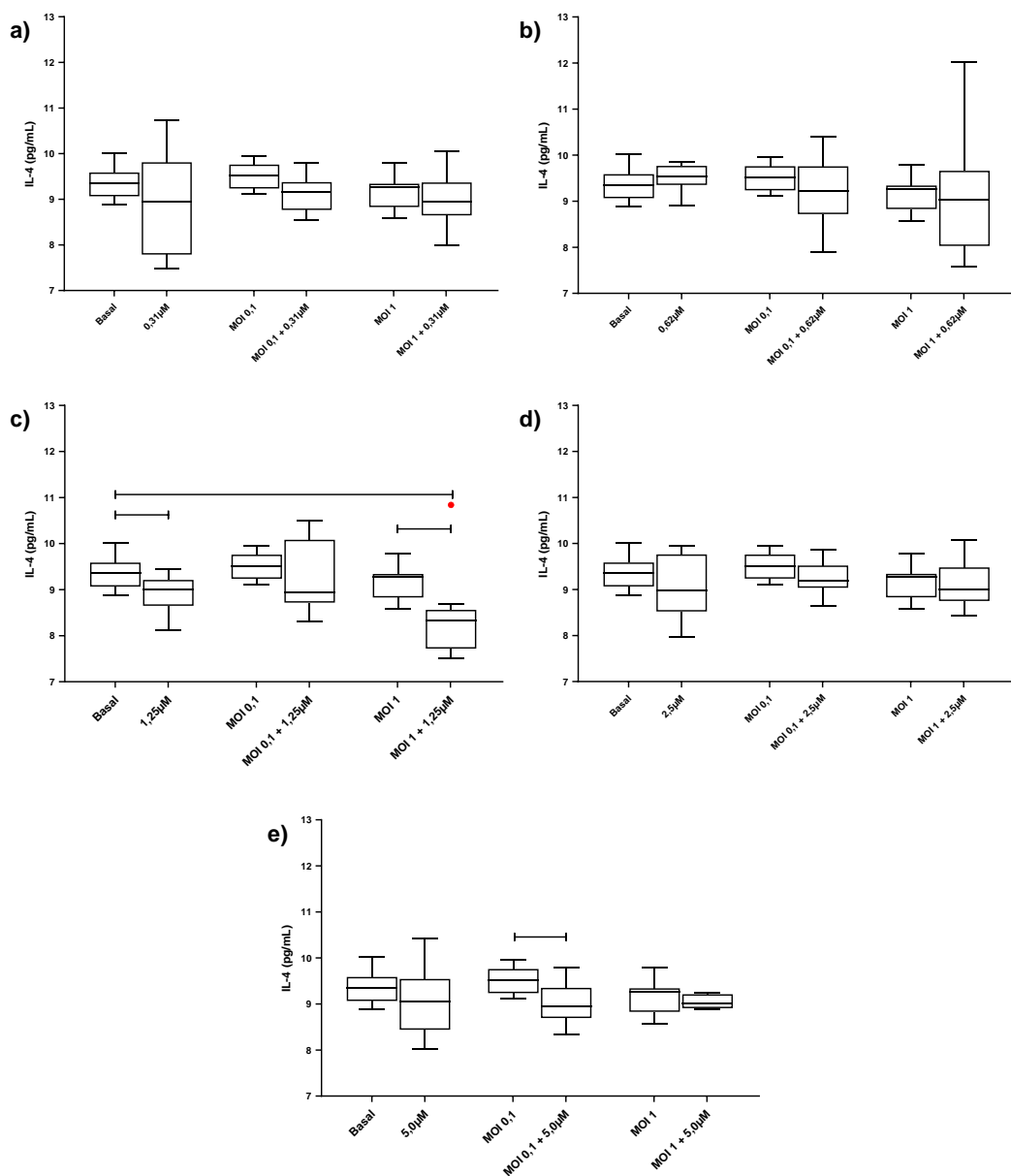


Figura 40: Influência da curcumina na produção de IL-4 em cultivo de micróglia BV2 na presença do vírus Zika após 24h. A) O tratamento com curcumina na concentração 0,31 μM não alterou a produção de IL-4 pelas células BV2 durante a infecção com o vírus Zika ($p=0,1101$); B) O tratamento com 0,62 μM de curcumina não alterou a produção de IL-4 pelas células BV2 durante a infecção com o vírus Zika ($p=0,1919$); C) O tratamento com 1,25 μM de Curcumina reduziu a produção de IL-4 pelo grupos de células que estava na presença de MOI 1 de vírus Zika ($p<0,0001$); D) O tratamento com 2,5 μM de curcumina não alterou a produção de IL-4 pelas micróglia BV2 durante a infecção pelo vírus Zika ($p=0,2825$); E) O tratamento com 5 μM de curcumina reduziu a produção de IL-4 pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 ($p=0,0421$). Avaliações realizadas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.13. Avaliação do papel da curcumina sobre a produção de IL-6 em micróglia BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a resposta das micróglia BV2 frente à infecção com o vírus Zika e o papel da curcumina durante a infecção, foi realizada a quantificação da IL-6 no sobrenadante dos cultivos de micróglia BV2, utilizando a metodologia descrita no item 4.5.10.

Segundo os nossos dados, a infecção com o vírus Zika aumentou a produção de IL-6 pelas micróglia BV2 (6,45 pg/mL) tanto na infecção com MOI 0,1 (9,62 pg/mL), quanto na infecção com MOI 1 do vírus (23,38 pg/mL) (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 41a). O tratamento com a curcumina aumentou a produção de IL-6 pelas BV2 apenas no grupo de células tratadas com 0,31 μM da curcumina, com aumento de 6,45 pg/mL (basal) para 9,4 pg/mL (Kruskal-Wallis, $p = 0,0007$; Figura 41b).

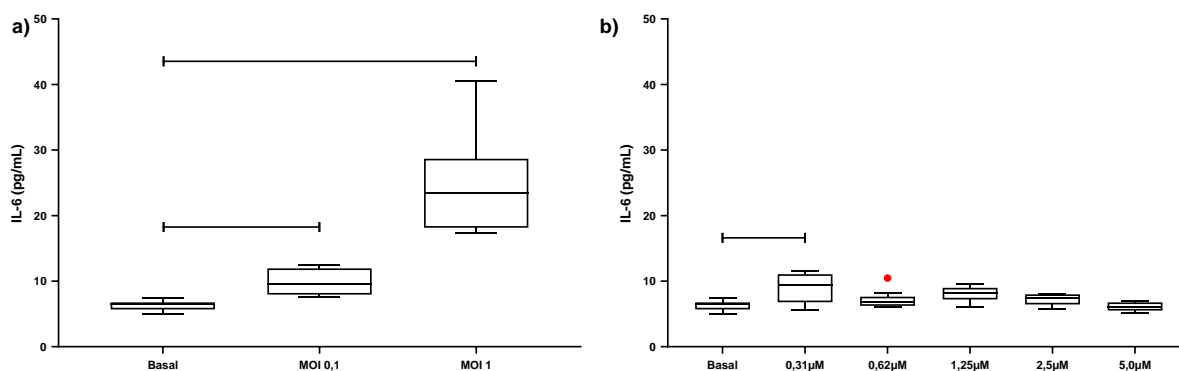


Figura 41: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IL-6 em cultivos de micróglia BV2 após 24h. A) Houve o aumento da produção de IL-6 pelas micróglia BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 de vírus Zika ($p < 0,0001$); B) O tratamento com 0,31 μM de curcumina aumentou a produção de IL-6 pelas micróglia BV2 ($p = 0,0007$). Avaliações realizadas pelo teste ANOVA ou Kruskal-Wallis seguido do teste de Tukey ou de Dunn para múltiplas comparações.

Durante a infecção, o tratamento com curcumina na concentração de 0,31 μM não alterou a produção de IL-6 pelas células infectadas com MOI 0,1

do vírus, mas reduziu a produção pelas micróglia infectadas com MOI 1, diminuindo a produção de 23,38 pg/mL no grupo infectado com MOI 1 para 12,41 pg/mL no grupo infectado e tratado (Kruskal-Wallis, $p=0,0172$; Figura 42a). Já o tratamento com 1,25 μM de curcumina aumentou a produção de IL-6 pelo grupo de células infectadas com MOI 0,1, aumentando a produção desta citocina de 9,62 pg/mL (células infectadas com MOI 0,1) para 15,84 pg/mL (células infectadas e tratadas) (teste t , $p<0,0001$; Figura 42b). De forma contrária, o tratamento com curcumina a 5 μM reduziu a produção de IL-6 no grupo de células infectadas também com o vírus no MOI 0,1, reduzindo a produção para 6,94 pg/mL no grupo infectado e tratado (teste t , $p=0,0051$; Figura 42c). O tratamento com 0,62 μM (ANOVA, $p=0,3246$; Figura 42d) e com 2,5 μM (Kruskal-Wallis, $p=0,0752$; Figura 42e) de curcumina não alterou a produção de IL-6 pelas células infectadas com ambas as multiplicidades virais.

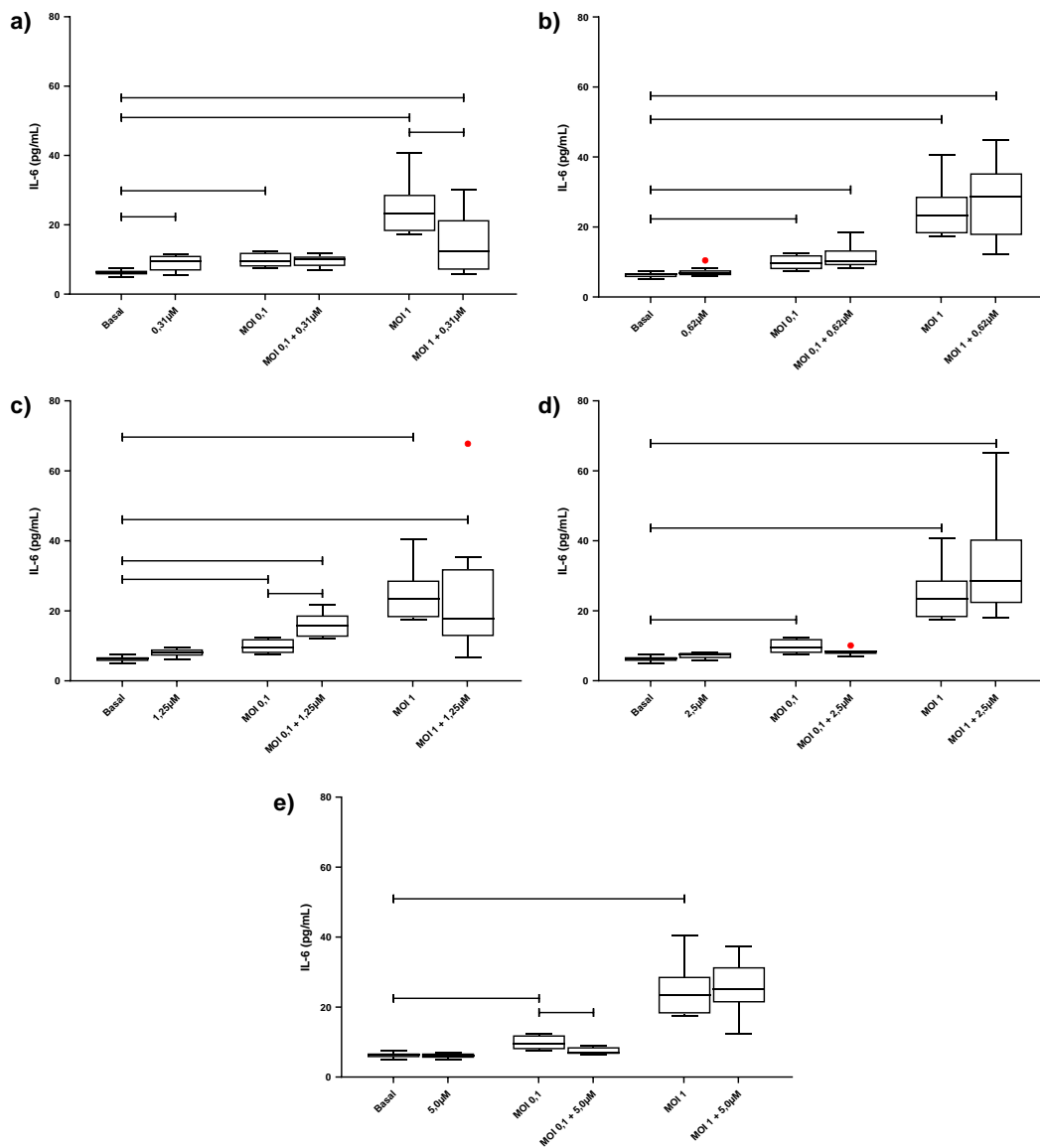


Figura 42: Influência da curcumina na produção de IL-6 em cultivo de micróglia BV2 na presença do vírus Zika após 24h. A) A curcumina na concentração 0,31 μM não alterou a produção de IL-6 pelo grupo de células infectado com MOI 0,1 do vírus ($p=0,0172$); B) Não houve diferença estatística entre os grupos infectados com MOI 0,1 e MOI 1 do vírus e os que receberam o tratamento com 0,62 μM de curcumina ($p=0,3246$); C) O tratamento com 1,25 μM de curcumina aumentou a produção de IL-6 pelo grupo de células que estava na presença de MOI 0,1 de vírus ($p=0,0006$); D) O tratamento com curcumina 2,5 μM não alterou a produção estatisticamente a produção de IL-6 pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 de vírus Zika ($p=0,0752$); E) O tratamento com 5 μM de curcumina reduziu a produção de IL-6 pelas micróglia BV2 na presença de MOI 0,1 de vírus Zika. Avaliações realizadas pelo teste ANOVA ($p<0,0001$) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.14. Avaliação do papel da curcumina sobre a produção de IL-10 em micróglias BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a resposta das micróglias BV2 frente à infecção com o vírus Zika e o papel da curcumina durante a infecção, foi realizado a quantificação da IL-10 no sobrenadante dos cultivos de micróglias BV2, utilizando a metodologia descrita no item 4.5.10.

Os resultados obtidos mostraram que a infecção com o vírus Zika aumentou a produção de IL-10 pelas micróglias BV2, tanto na infecção com MOI 0,1 (11,35 pg/mL), quanto na infecção com MOI 1 (12,06 pg/mL) em relação ao basal (7,01 pg/mL) (ANOVA, $p=0,0066$; Figura 43a). O tratamento com a curcumina foi capaz de modificar a produção basal de IL-10 pelas micróglias BV2 apenas na concentração 0,31 μM , com aumentou da produção de 7,01 pg/mL (basal) para 12,79 pg/mL (Kruskal-Wallis, $p=0,0102$; Figura 43b).

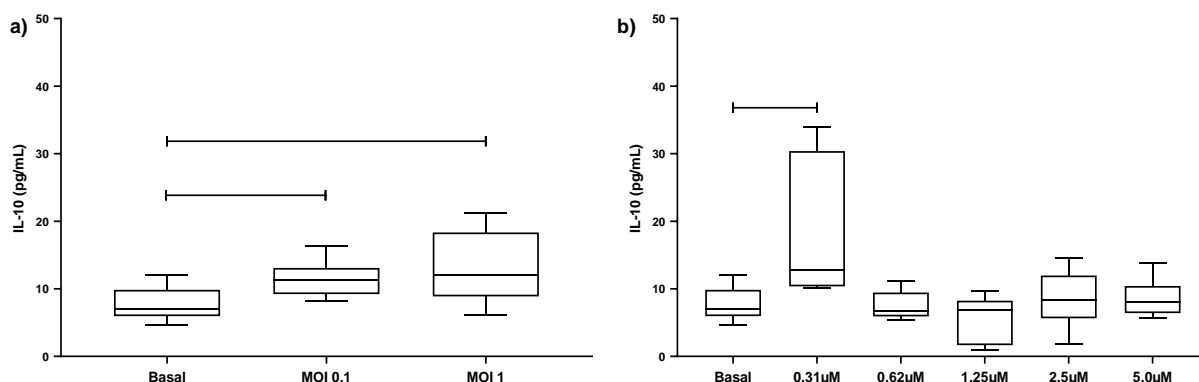


Figura 43: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IL-10 em cultivos de micróglias BV2 após 24h. A) Houve o aumento da produção de IL-10 pelas micróglias BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 de vírus Zika ($p=0,0066$); B) O tratamento com 0,31 μM de curcumina aumentou a produção de IL-10 pelas micróglias BV2. Não houve diferença estatística na produção de IL-10 pelos grupos tratados com as demais concentrações de curcumina. Avaliações realizadas pelo teste ANOVA ou teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Tukey ou teste de Dunn para múltiplas comparações.

Durante a infecção com o vírus Zika, a curcumina na concentração de 0,31 μM aumentou a produção de IL-10 pelas células infectadas com MOI 0,1 (11,35 pg/mL) para 15,29 pg/mL no grupo infectado e tratado (teste *t*, $p=0,0309$; Figura 44a). Entretanto, as demais concentrações do composto tenderam a diminuir a produção desta citocina. Para a concentração de 0,62 μM de curcumina, foi observado a diminuição da produção de IL-10 no grupo de células infectadas com MOI 1 (12,06 pg/mL) para 6,91 pg/mL no grupo infectado e tratado (teste *t*, $p=0,0335$; Figura 44b). O tratamento com 2,5 μM de curcumina reduziu a produção de IL-10 nas células infectadas com MOI 0,1 do vírus (11,35 pg/mL) para 7,01 pg/mL no grupo infectado e tratado (ANOVA, $p=0,0020$; Figura 44d). Já o tratamento com 5 μM de curcumina reduziu a produção de IL-10 tanto no grupo infectado com MOI 0,1 (11,35 pg/mL) para 7,33 pg/mL no grupo infectado e tratado, quanto no grupo infectado com o vírus no MOI 1 (12,06 pg/mL) para 7,75 pg/mL no grupo infectado e tratado (ANOVA, $p=0,0018$; Figura 44e).

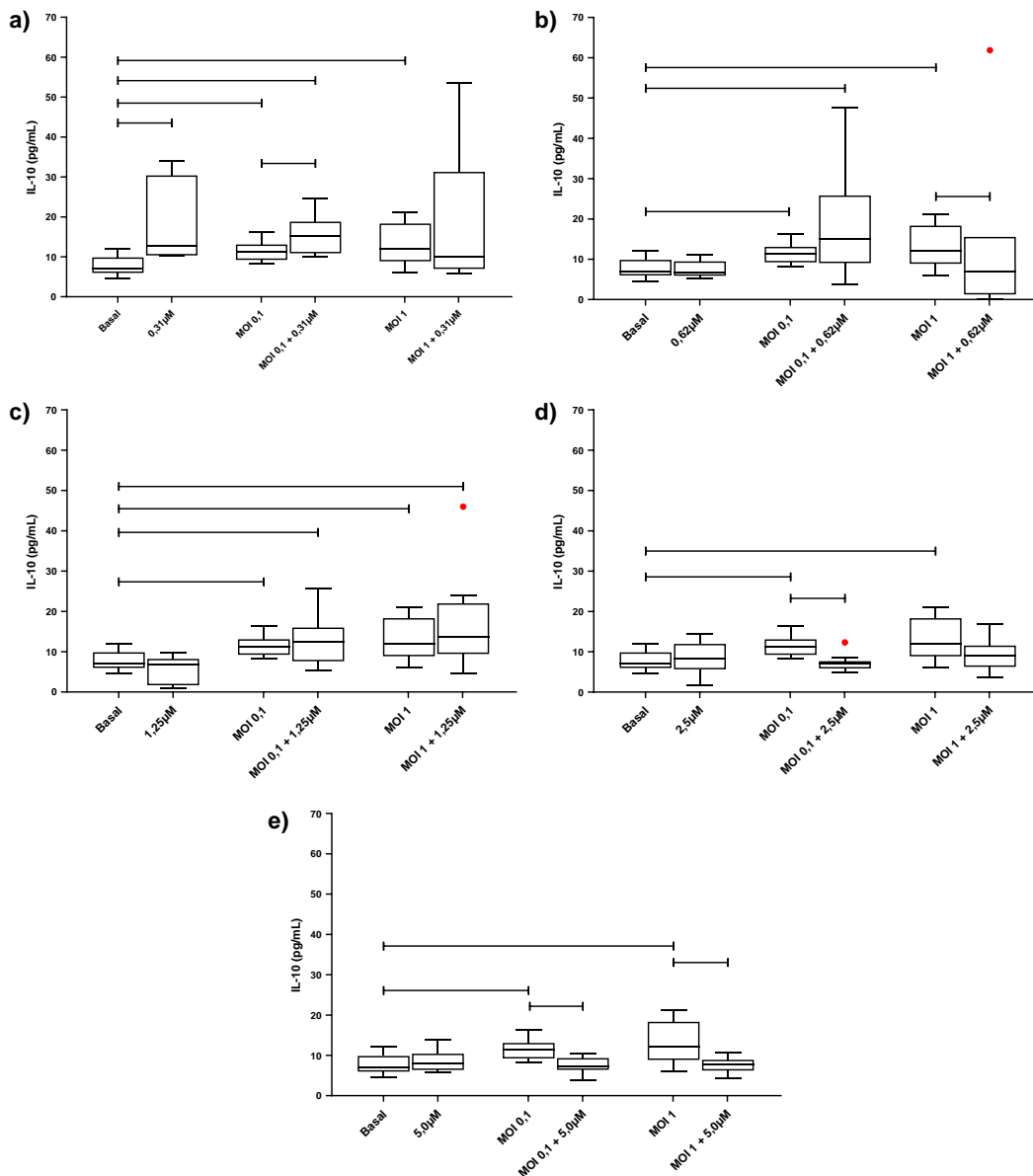


Figura 44: Influência da curcumina na produção de IL-10 em cultivo de micróglia BV2 na presença do vírus Zika após 24h. A) A curcumina na concentração 0,31 μM aumentou a produção de IL-10 pelas micróglia na presença de MOI 0,1 do vírus ($p=0,0007$); B) A curcumina na concentração 0,62 μM reduziu a produção de IL-10 pelas células BV2 na presença de MOI 1 de vírus ($p=0,0030$); C) Não houve diferença estatística entre os grupos infectados com MOI 0,1 e MOI 1 de vírus e os que receberam o tratamento com 1,25 μM de curcumina ($p=0,0006$); D) O tratamento com 2,5 μM de curcumina reduziu a produção de IL-10 pelo grupo de células que estava na presença de MOI 0,1 de vírus ($p=0,0028$); E) O tratamento com 5 μM de curcumina reduziu a produção de IL-10 pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 de vírus Zika. Avaliações realizadas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.15. Avaliação do papel da curcumina sobre a produção de IL-12 em micróglia BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a resposta das micróglia BV2 frente à infecção com o vírus Zika e o papel da curcumina durante a infecção, foi realizada a quantificação da IL-12 no sobrenadante dos cultivos de micróglia BV2, utilizando a metodologia descrita no item 4.5.10.

Os resultados obtidos mostraram que a infecção com o vírus Zika aumentou a produção de IL-12 pelas micróglia BV2 que estavam na presença de MOI 1 do vírus, com aumento de 0 pg/mL de IL-12 (basal) para 12,95 pg/mL (células infectadas) (Kruskal-Wallis, $p=0,0047$; Figura 45a). Já o tratamento com a curcumina não alterou estatisticamente a produção de IL-12 pelas micróglia BV2 (Kruskal-Wallis, $p=0,0445$; Figura 45b).

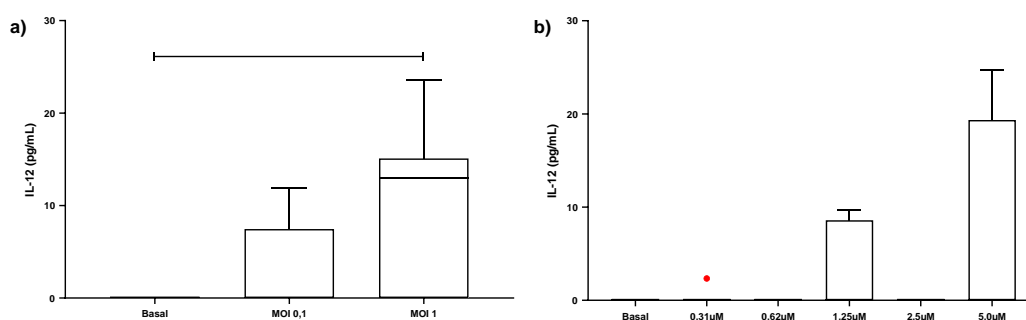


Figura 45: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IL-12 em cultivos de micróglia BV2 após 24h. A) Houve o aumento da produção de IL-12 pelas micróglia BV2 na presença de MOI 1 de vírus Zika ($p=0,0047$); B) O tratamento com a curcumina não alterou a produção de IL-12 pelas micróglia BV2 ($p=0,0445$). Avaliações realizadas pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações.

Durante a infecção com o vírus Zika, a curcumina em todas as concentrações testadas não alterou a produção de IL-12 pelas micróglia BV2, tanto na presença de MOI 0,1 do vírus, quanto na presença de MOI 1 (Kruskal-Wallis, $p=0,1142$, seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações; Figura 46).

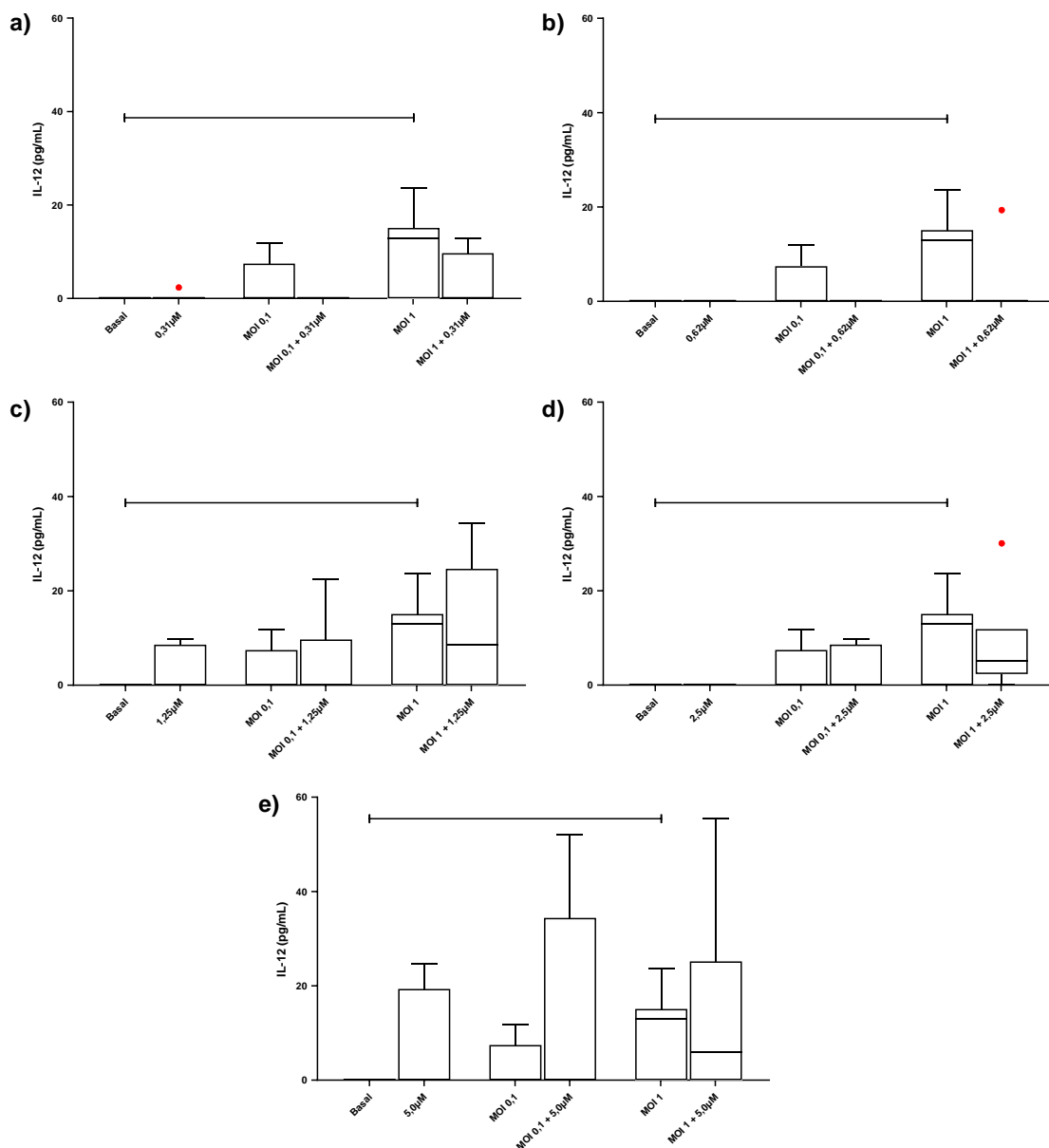


Figura 46: Influência da curcumina na produção de IL-12 em cultivo de micróglia BV2 na presença do vírus Zika após 24h. A) A curcumina na concentração 0,31 µM não alterou a produção de IL-12 pelas micróglia na presença do vírus ($p=0,0074$); B) A curcumina na concentração 0,32 µM não alterou a produção de IL-12 pelas micróglia na presença do vírus ($p=0,0033$); C) A curcumina na concentração 1,25 µM não alterou a produção de IL-12 pelas micróglia na presença do vírus ($p=0,0289$); D) A curcumina na concentração 2,5 µM não alterou a produção de IL-12 pelas micróglia na presença do vírus ($p=0,0026$); E) A curcumina na concentração 5 µM não alterou a produção de IL-12 pelas micróglia na presença do vírus ($p=0,1173$); Avaliações realizadas pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações.

5.16. Avaliação do papel da curcumina sobre a produção de IL-17 em micróglia BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a resposta das micróglia BV2 frente à infecção com o vírus Zika e o papel da curcumina durante a infecção, foi realizada a quantificação da IL-17 no sobrenadante dos cultivos de micróglia BV2, utilizando a metodologia descrita no item 4.5.10.

Os resultados obtidos mostraram que a infecção com o vírus Zika aumentou a produção de IL-17 pelas micróglia BV2, tanto na infecção com MOI 0,1 (8,37 pg/mL), quanto na infecção com MOI 1 (10,51 pg/mL) em relação ao basal (7,45 pg/mL) (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$; Figura 47a). O tratamento com a curcumina foi capaz de modificar a produção basal de IL-17 pelas micróglia BV2 apenas na concentração 0,31 μM , com aumento da produção de 7,45 pg/mL (basal) para 7,85 pg/mL (Mann-Whitney, $p = 0,0215$; Figura 47b).

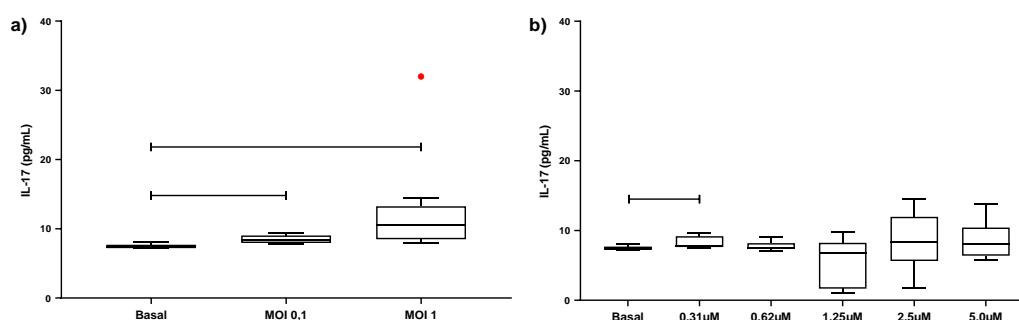


Figura 47: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IL-17 em cultivos de micróglia BV2 após 24h. A) Houve o aumento da produção de IL-17 pelas micróglia BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 de vírus Zika ($p < 0,0001$); B) O tratamento com 0,31 μM de curcumina aumentou a produção de IL-17 pelas micróglia BV2. Não houve diferença estatística na produção de IL-17 pelos grupos tratados com as demais concentrações de curcumina. Avaliações realizadas pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações.

Durante a infecção, o tratamento com a curcumina na concentração de 0,31 μM não alterou a produção de IL-17 pelas células infectadas com MOI 0,1 e MOI 1 do vírus que receberam o tratamento em relação às células infectadas não-tratadas (Kruskal-Wallis, $p=0,0006$; Figura 48a). Para os tratamentos com 0,62 μM (Figura 48b) e 1,25 μM (Figura 48c), também não observamos diferença na produção de IL-17 pelas células infectadas e tratadas (Kruskal-Wallis, $p=0,0002$ e $p<0,0001$, respectivamente, seguidos pelo teste de Dunn para múltiplas comparações). Já o tratamento com 2,5 μM de curcumina reduziu a produção de IL-17 no grupo de células infectadas com MOI 0,1 do vírus, reduzindo a produção desta citocina de 8,37 pg/mL (células infectadas) para 7,01 pg/mL (células infectadas e tratadas) (Mann-Whitney, $p=0,0082$; Figura 48d), enquanto o tratamento com 5 μM reduziu a produção pelas células infectadas com MOI 1, diminuindo de 10,51 pg/mL no grupo infectado para 7,75 pg/mL no grupo infectado e tratado (Mann-Whitney, $p=0,0076$; Figura 48e).

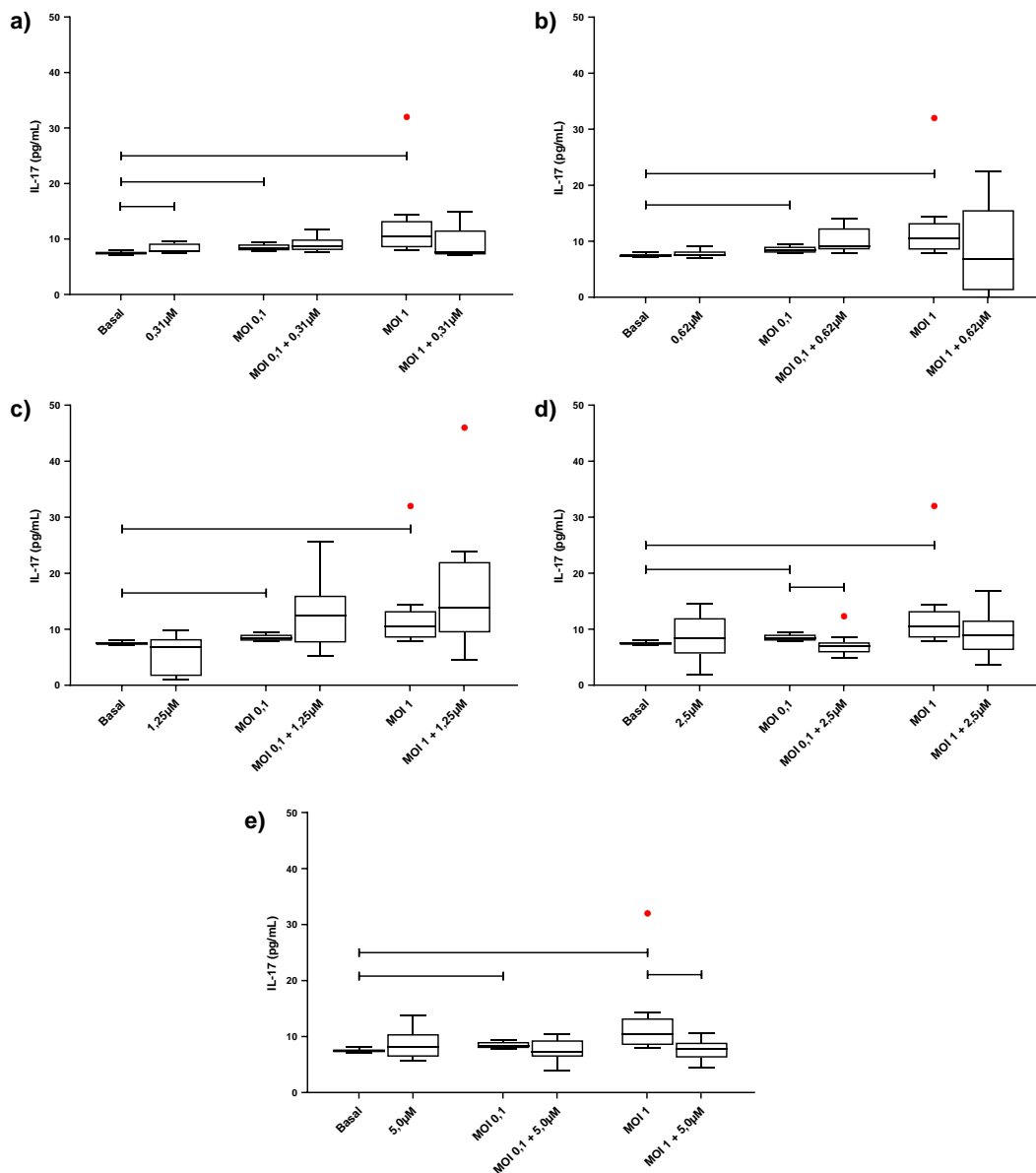


Figura 48: Influência da curcumina na produção de IL-17 em cultivo de micróglia BV2 na presença do vírus Zika após 24h. A) A curcumina na concentração 0,31 µM não alterou a produção de IL-17 pelas micróglia na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus ($p=0,0006$); B) A curcumina na concentração 0,62 µM não alterou a produção de IL-17 pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus ($p=0,0002$); C) Não houve diferença estatística entre os grupos infectados com MOI 0,1 e MOI 1 de vírus e os que receberam o tratamento com 1,25 µM de curcumina ($p<0,0001$); D) O tratamento com 2,5 µM de curcumina reduziu a produção de IL-10 pelo grupo de células que estava na presença de MOI 0,1 de vírus ($p=0,0035$); E) O tratamento com 5 µM de curcumina reduziu a produção de IL-10 pelas células BV2 na presença de MOI 1 de vírus Zika ($p=0,0047$). Avaliações realizadas pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações.

5.17. Avaliação do papel da curcumina sobre a produção de IFN- γ em micróglias BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a resposta das micróglias BV2 frente à infecção com o vírus Zika e o papel da curcumina durante a infecção, foi realizada a quantificação da IFN- γ no sobrenadante dos cultivos de micróglias BV2, utilizando a metodologia descrita no item 4.5.10.

Os nossos dados mostraram que a infecção com o vírus Zika aumenta a produção de IFN- γ pelas micróglias BV2 apenas durante a infecção com MOI 1 do vírus, com o aumento da produção de 7,15 pg/mL (basal) para 12,93 pg/mL (infectado com MOI 1). Não houve alterações na produção das células infectadas com MOI 0,1 (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 49a).

Em relação ao tratamento com a curcumina, foram observadas alterações na produção de IFN- γ pelas micróglias BV2 apenas nos grupos tratados com 0,31 μ M e 1,25 μ M de curcumina. Para o grupo não-infectado que recebeu o tratamento com 0,31 μ M de curcumina, houve o aumento da produção de IFN- γ de 7,15 pg/mL (basal) para 7,54 pg/mL. Já o tratamento com 1,25 μ M de curcumina reduziu esta produção para 6,39 pg/mL em relação ao basal (7,15 pg/mL) (ANOVA, $p = 0,0029$; Figura 49b).

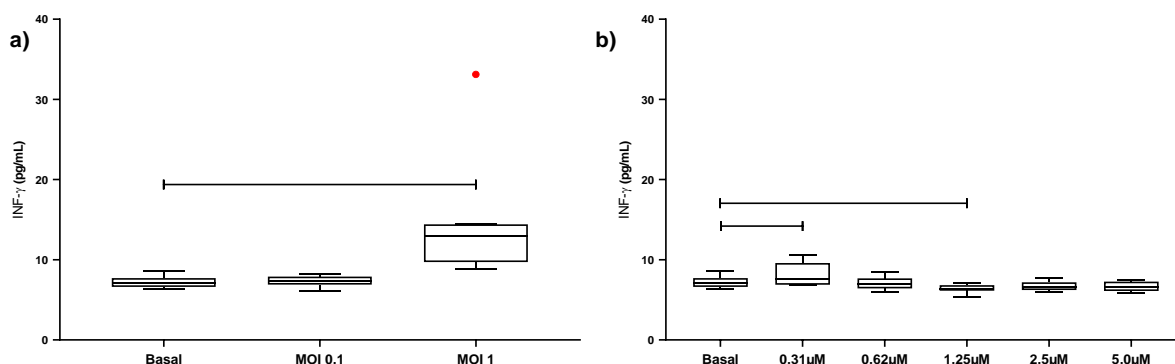


Figura 49: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de IFN- γ em cultivos de micróglias BV2 após 24h. A) Houve o aumento da produção de IFN- γ pelas micróglias BV2 na presença de MOI 1 do vírus, mas não houve diferença estatística na produção desta citocina no grupo de micróglias BV2 na presença de MOI 0,1 de vírus Zika

(p<0,0001); B) O tratamento com 0,31 µM de curcumina aumentou a produção de IFN-γ pelas micróglia BV2. Já o tratamento com 1,25 µM de curcumina reduziu a produção basal de IFN-γ pelas micróglia BV2. Não houve diferença estatística na produção de IFN-γ pelos grupos tratados com as demais concentrações de curcumina. Avaliações realizadas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

Durante a infecção, o tratamento com a curcumina na concentração de 0,31 µM alterou a produção de IFN-γ apenas no grupo infectado com MOI 1 de vírus, reduzindo a produção de 12,93 pg/mL no grupo infectado para 7,34 pg/mL no grupo infectado e tratado (ANOVA, $p=0,0011$; Figura 50a). Para os tratamentos com 0,62 µM e 2,5 µM, este padrão de alteração no nível de produção de IFN-γ se manteve. Para o tratamento com 0,62 µM, houve a redução de 12,93 pg/mL (infectado com MOI 1) para 6,09 pg/mL (infectado e tratado) (teste t , $p=0,0004$; Figura 50b); e no tratamento com 2,5 µM, esta redução foi para 6,69 pg/mL no grupo infectado com MOI 1 e tratado (ANOVA, $p<0,0001$; Figura 50d). O tratamento com 5 µM de curcumina foi o único capaz de modular as duas condições experimentais, reduzindo a produção de IFN-γ de 7,34 pg/mL no grupo infectado com MOI 0,1 para 6,41 pg/mL no grupo infectado e tratado, e redução de 12,93 pg/mL no grupo infectado com MOI 1 para 6,74 pg/mL no grupo infectado e tratado (ANOVA, $p<0,0001$; Figura 50e). Não houve alterações significativas na produção de IFN-γ durante a infecção nas micróglia que receberam o tratamento com 1,25 µM de curcumina (ANOVA, $p<0,0001$; Figura 50c).

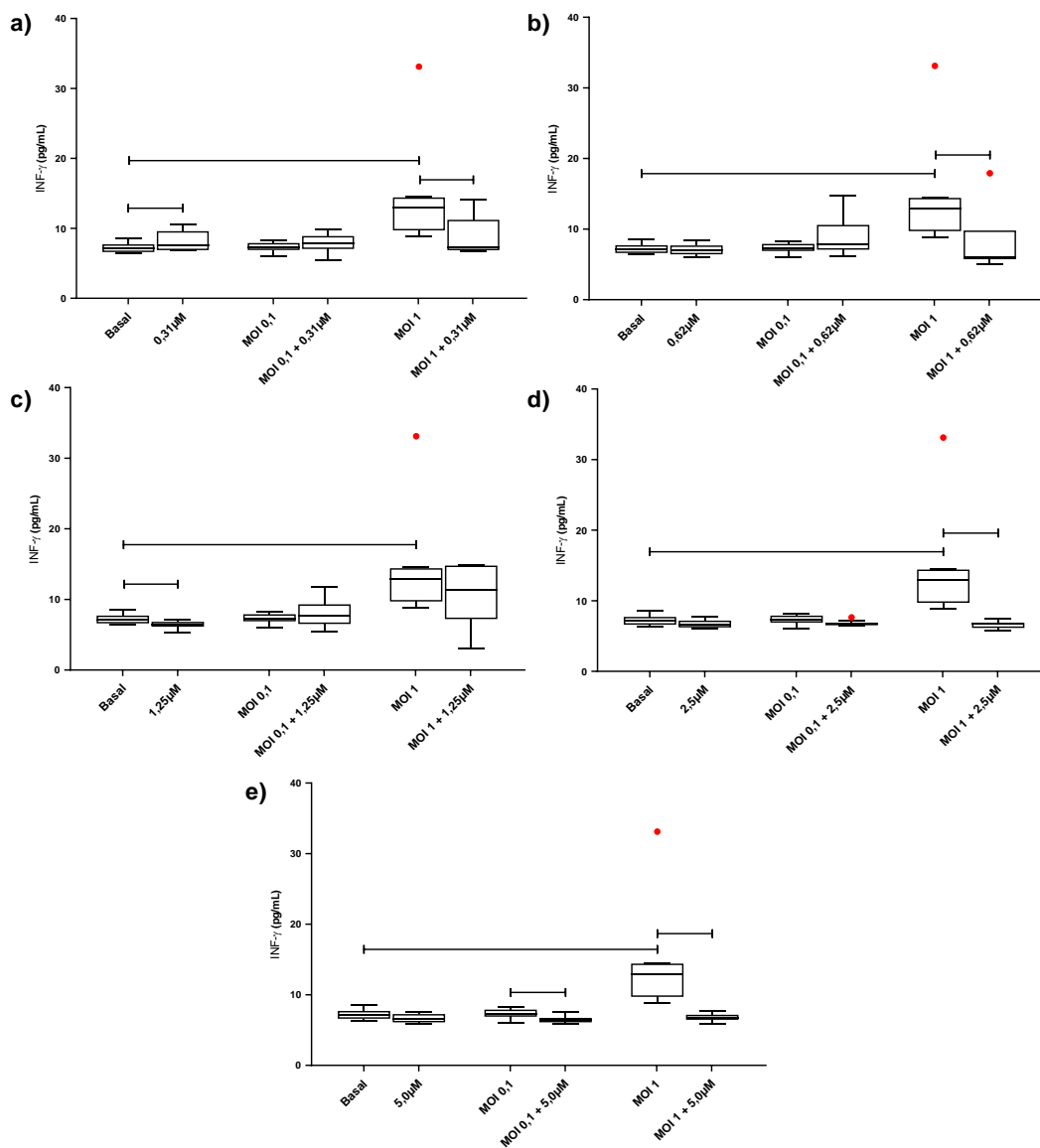


Figura 50: Influência da curcumina na produção de IFN- γ em cultivo de micróglia BV2 na presença do vírus Zika após 24h. A) A curcumina na concentração 0,31 μ M diminuiu a produção de IFN- γ pelas micróglia na presença de MOI 1 do vírus ($p=0,0011$); B) A curcumina na concentração 0,62 μ M diminuiu a produção de IFN- γ pelas micróglia na presença de MOI 1 de vírus ($p=0,0004$); C) Não houve diferença estatística entre os grupos infectados com MOI 0,1 e MOI 1 de vírus e os que receberam o tratamento com 1,25 μ M de curcumina ($p<0,0001$); D) A curcumina na concentração 2,5 μ M diminuiu a produção de IFN- γ pelas micróglia na presença de MOI 1 ($p<0,0001$); E) O tratamento com 5 μ M de curcumina reduziu a produção de IFN- γ pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 de vírus Zika. Avaliações realizadas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.18. Avaliação do papel da curcumina sobre a produção de MCP-1 em micróglias BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a resposta das micróglias BV2 frente à infecção com o vírus Zika e o papel da curcumina durante a infecção, foi realizada a quantificação da MCP-1 no sobrenadante dos cultivos de micróglias BV2, utilizando a metodologia descrita no item 4.5.10.

Segundo os nossos resultados, a infecção com o vírus Zika aumenta a produção de MCP-1 pelas micróglias BV2 durante a infecção com MOI 0,1 e MOI 1 do vírus, com o aumento da produção de 1306 pg/mL (basal) para 3237 pg/mL nos grupos infectados com MOI 0,1 e para 5536 pg/mL nos grupos infectados com MOI 1 (ANOVA, $p=0,0017$; Figura 51a).

Em relação ao tratamento com a curcumina, observamos alterações na produção de MCP-1 pelas micróglias BV2 apenas no grupo tratado com 1,25 μM de curcumina. Neste grupo, foi observado o aumento da produção desta citocina de 1306 pg/mL (basal) para 4163 pg/mL (ANOVA, $p<0,0001$; Figura 51b).

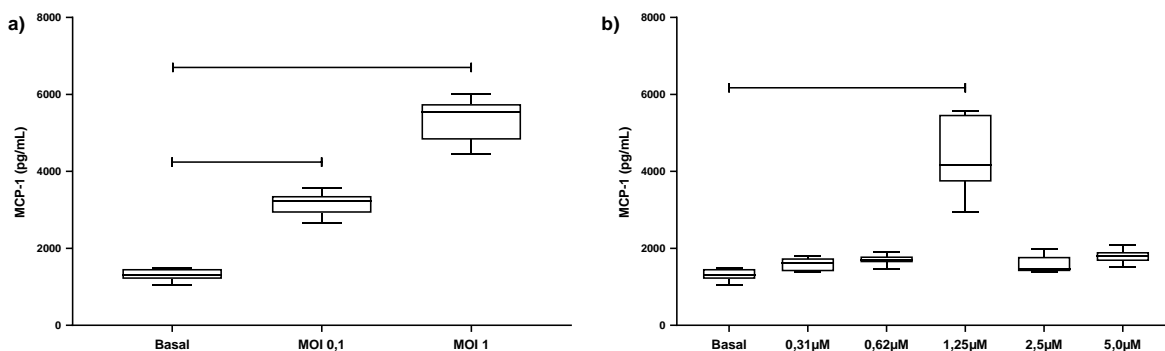


Figura 51: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de MCP-1 em cultivos de micróglias BV2 após 24h. A) Houve o aumento da produção de MCP-1 pelas micróglias BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus ($p<0,0001$); B) O tratamento com 1,25 μM de curcumina aumentou a produção de MCP-1 pelas micróglias BV2. Não houve diferença estatística na produção de MCP-1 pelos grupos tratados com as demais concentrações de curcumina. Avaliações realizadas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações

Durante a infecção, os tratamentos com a curcumina nas concentrações 0,31 μM , 0,62 μM e 1,25 μM aumentaram a produção de MCP-1 apenas nos grupos infectados com MOI 0,1 do vírus Zika. Para o grupo tratado com 0,31 μM , o aumento foi de 3237 pg/mL no grupo infectado com MOI 0,1 para 3766 pg/mL no grupo infectado e tratado (ANOVA, $p < 0,0001$, Figura 52a). Já o grupo tratado com 0,62 μM teve o aumento para 3545 pg/mL em relação ao grupo infectado que não tratado (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 52b); e o tratado com 1,25 μM apresentou o aumento para 5244 pg/mL em relação ao grupo infectado não tratado (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 52c). Já para os grupos tratados com 2,5 μM e 5 μM de curcumina, observamos o aumento da produção de MCP-1 apenas nos grupos infectados com MOI 1 do vírus Zika. Este aumento foi de 5536 pg/mL no grupo infectado com MOI 1 para 7678 pg/mL no grupo infectado e tratado com 2,5 μM (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 52d) e aumento para 5907 pg/mL para o grupo infectado e tratado com 5 μM de curcumina (ANOVA, $p < 0,0001$; Figura 52e).

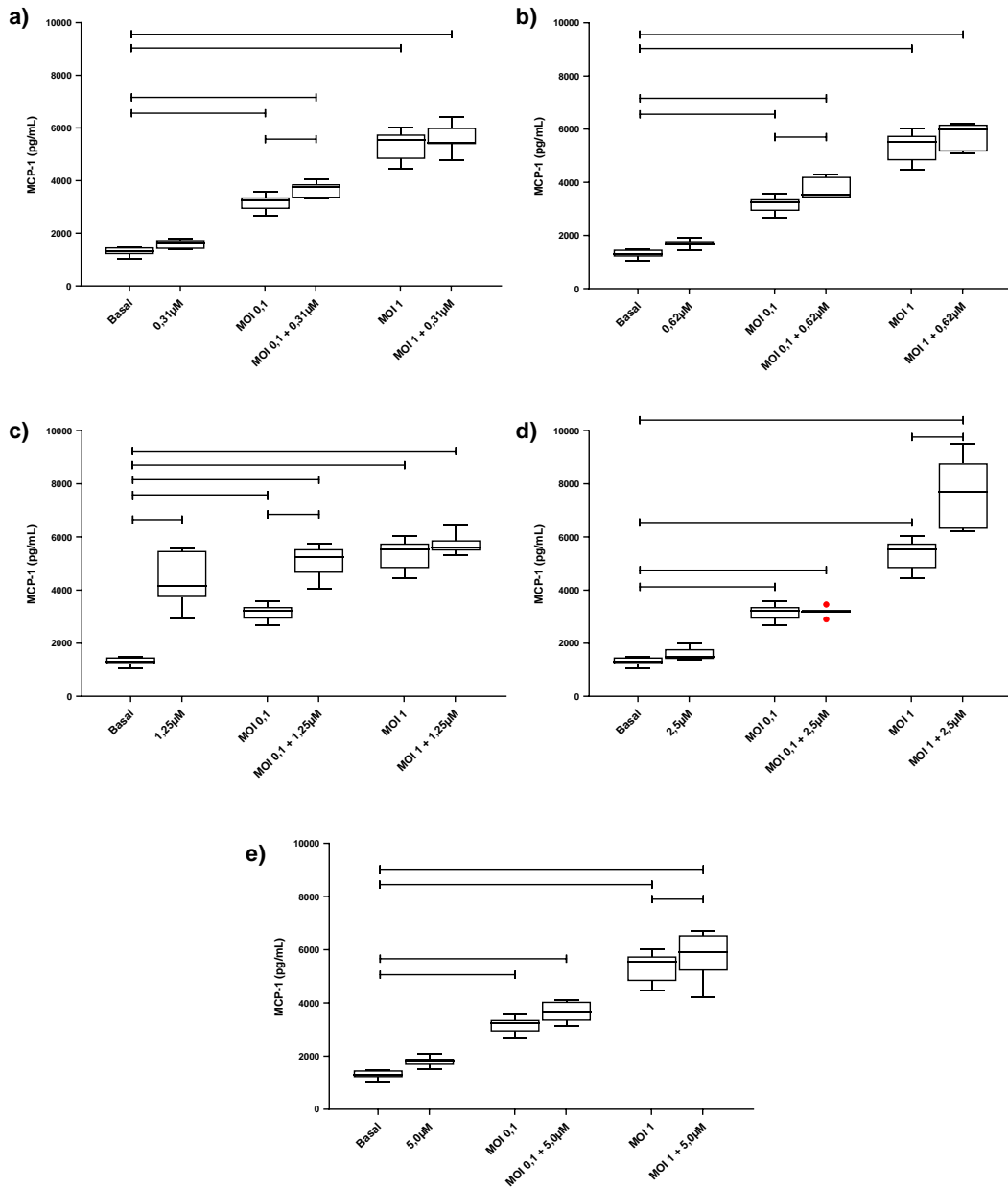


Figura 52: Influência da curcumina na produção de MCP-1 em cultivo de micróglia BV2 na presença do vírus Zika após 24h. A) A curcumina na concentração 0,31 µM aumentou a produção de MCP-1 pelas micróglia na presença de MOI 0,1 do vírus ($p < 0,0001$); B) A curcumina na concentração 0,62 µM aumentou a produção de MCP-1 pelas micróglia na presença de MOI 0,1 de vírus ($p < 0,0001$); C) A curcumina na concentração 1,25 µM aumentou a produção de MCP-1 pelas micróglia na presença de MOI 0,1 de vírus ($p < 0,0001$); D) A curcumina na concentração 2,5 µM aumentou a produção de MCP-1 pelas micróglia na presença de MOI 1 ($p < 0,0001$); E) O tratamento com 5 µM de curcumina aumentou a produção de MCP-1 pelas células BV2 na presença de MOI 1 de vírus Zika ($p < 0,0001$). Avaliações realizadas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.19. Avaliação do papel da curcumina sobre a produção de TNF- α em micróglia BV2 durante a infecção com o vírus Zika

Para avaliar a resposta das micróglia BV2 frente à infecção com o vírus Zika e o papel da curcumina durante a infecção, foi realizada a quantificação da TNF- α no sobrenadante dos cultivos de micróglia BV2, utilizando a metodologia descrita no item 4.5.10.

Os dados obtidos mostraram que a infecção com o vírus Zika aumenta a produção de TNF- α pelas micróglia BV2 durante a infecção com MOI 0,1 e MOI 1 do vírus, com o aumento da produção de 14,79 pg/mL (basal) para 57,81 pg/mL durante a infecção com MOI 0,1 e para 48,24 pg/mL durante a infecção com MOI 1 (ANOVA, $p=0,0017$; Figura 53a).

Em relação ao tratamento com a curcumina, observamos alterações na produção de TNF- α pelas micróglia BV2 apenas no grupo tratado com 1,25 μ M de curcumina. Neste grupo, foi observado o aumento da produção desta citocina de 14,79 pg/mL (basal) para 141,9 pg/mL quando tratado com 1,25 μ M de curcumina (ANOVA, $p<0,0001$; Figura 53b).

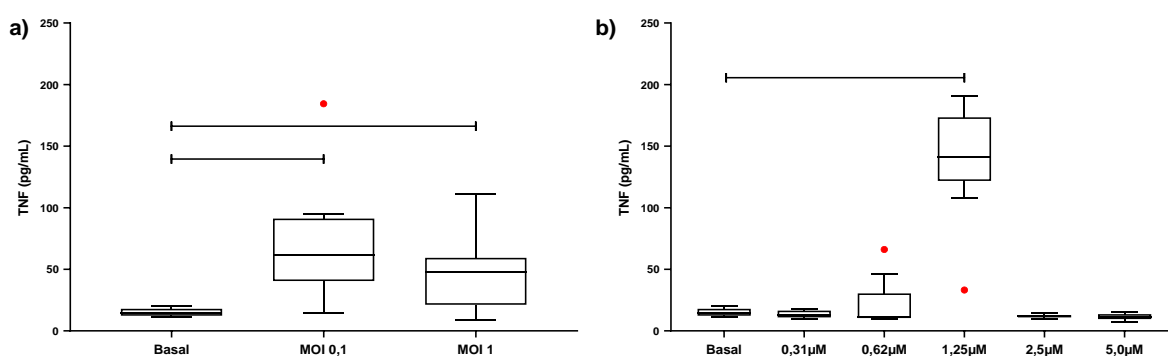


Figura 53: Influência da infecção pelo vírus Zika e da curcumina na produção de TNF- α em cultivos de micróglia BV2 após 24h. A) Houve o aumento da produção de TNF- α pelas micróglia BV2 na presença de MOI 0,1 e MOI 1 do vírus ($p<0,0001$); B) O tratamento com 1,25 μ M de curcumina aumentou a produção de TNF- α pelas micróglia BV2. Não houve diferença estatística na produção de TNF- α pelos grupos tratados com as demais

concentrações de curcumina. Avaliações realizadas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações

Durante a infecção, o tratamento com a curcumina na concentração de 0,31 μM alterou a produção de TNF- α quando infectado com MOI 0,1 de vírus, reduzindo a produção de 57,81 pg/mL no grupo de células infectadas para 16,53 pg/mL no grupo de células infectadas e tratadas (ANOVA, $p=0,0005$; Figura 54a). Já no tratamento com 0,62 μM , a curcumina reduziu a produção de TNF- α pelas micróglias BV2 infectadas com MOI 0,1 (57,81 pg/mL) para 21,56 pg/mL no grupo infectado e tratado, mas aumentou a produção no grupo de células infectadas com MOI 1 (48,24 pg/mL) para 77,59 pg/mL no grupo infectado e tratado (Figura 54b). Já o tratamento com 1,25 μM de curcumina, observamos a redução da produção de TNF- α pelas micróglias BV2 infectadas com MOI 1 do vírus (48,24 pg/mL) para 20,04 pg/mL no grupo infectado e tratado (ANOVA, $p<0,0001$; Figura 54c). O tratamento com 2,5 μM de curcumina aumentou a produção de TNF- α das micróglias BV2 que estavam na presença de MOI 1 (48,24 pg/mL) para 123,3 pg/mL (ANOVA, $p<0,0001$; Figura 54d); e o grupo tratado com 5 μM reduziu a produção de TNF- α pelas micróglias BV2 na presença de MOI 0,1 (57,81 pg/mL) para 38,98 pg/mL no grupo infectado e tratado, mas aumentou a produção pelas micróglias na presença de MOI 1 (48,24 pg/mL) para 97,47 pg/mL no grupo infectado e tratado (ANOVA, $p<0,0001$; Figura 54e)

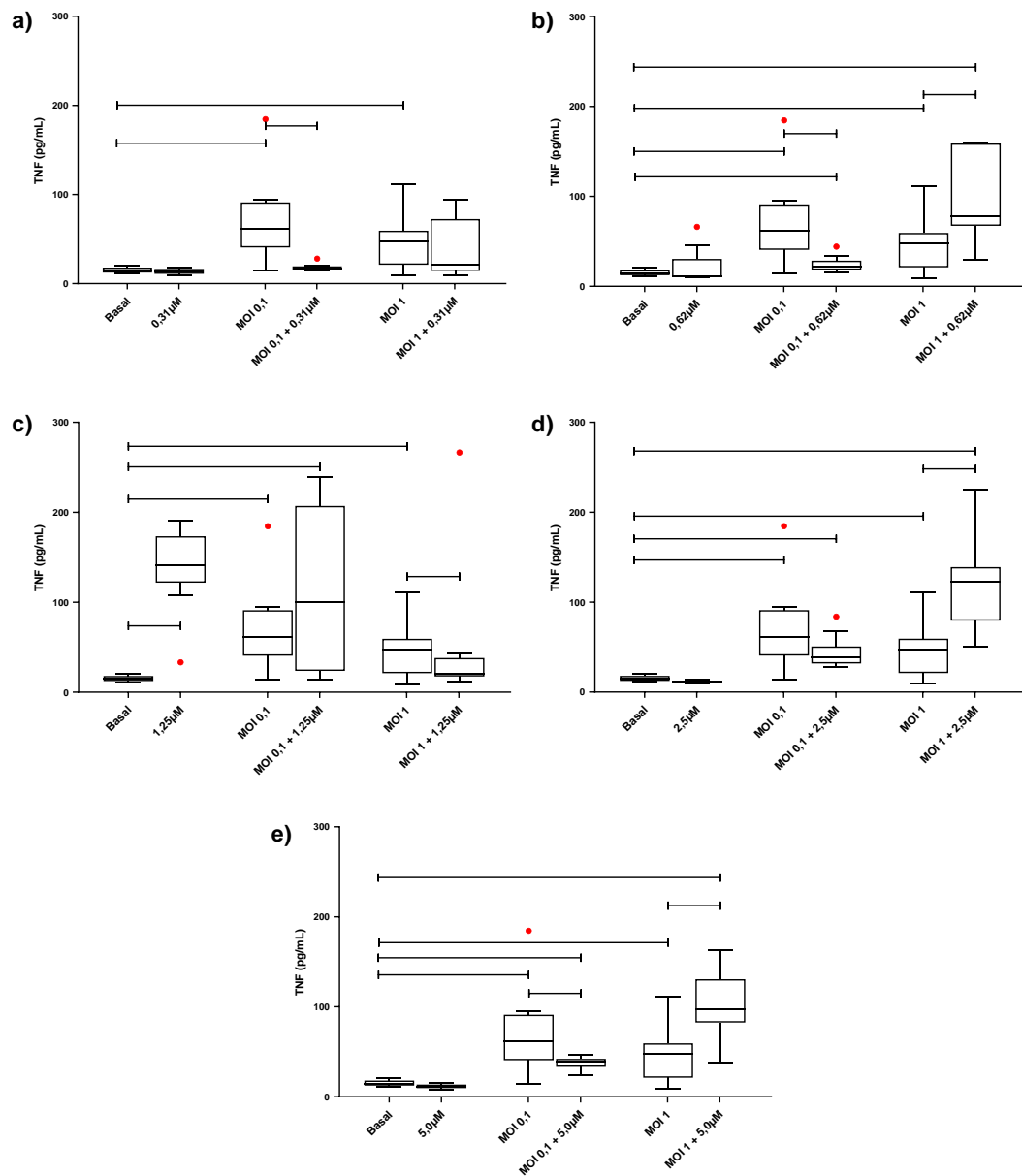


Figura 54: Influência da curcumina na produção de TNF- α em cultivo de micróglia BV2 na presença do vírus Zika após 24h. A) A curcumina na concentração 0,31 μ M diminuiu a produção de TNF- α pelas micróglia na presença de MOI 0,1 do vírus ($p < 0,0001$); B) A curcumina na concentração 0,62 μ M diminuiu a produção de TNF- α pelas micróglia na presença de MOI 0,1 de vírus, mas aumentou esta produção nas células BV2 que estavam na presença de MOI 1 ($p < 0,0001$); C) A curcumina na concentração 1,25 μ M diminuiu a produção de TNF- α pelas micróglia na presença de MOI 1 de vírus. Não houve alteração estatística na produção de MCP-1 pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 ($p < 0,0001$); D) A curcumina na concentração 2,5 μ M aumentou a produção de TNF- α pelas micróglia na presença de MOI 1, mas não alterou a produção pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 de vírus ($p < 0,0001$); E) O tratamento com 5 μ M de curcumina diminuiu a produção de TNF- α pelas células BV2 na presença de MOI 0,1 de vírus Zika, mas aumentou a produção pelas células BV2 na presença de MOI 1 de vírus ($p < 0,0001$). Avaliações realizadas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.20. Sumário dos resultados obtidos

Para melhor visualização dos resultados, os parâmetros estudados e os grupos de comparação então sintetizados nas tabelas 1, 2, 3 e 4. A tabela 1 mostra a comparação entre os grupos de células infectadas com 0,1 e 1 MOI de vírus Zika em relação às células no estado basal; a tabela 2 mostra a comparação entre os grupos de células tratadas com a curcumina (0,31, 0,62, 1,25, 2,5 e 5 μM) em relação às células no estado basal; a tabela 3 compara as células infectadas com 0,1 MOI de vírus e que receberam os tratamentos com diferentes concentrações da curcumina em relação às células também infectadas com 0,1 MOI de vírus, mas que não receberam o tratamento; e a tabela 4 compara as células infectadas com 1 MOI de vírus e que receberam os tratamentos com diferentes concentrações da curcumina em relação às células que também foram infectadas com 1 MOI de vírus, mas que não receberam o tratamento.

Tabela 2: Comparação dos resultados obtidos pelos grupos de células infectadas com 0,1 ou 1 MOI de vírus Zika em relação às células no estado basal.

Experimentos	Em relação ao basal		MOI 0,1 vs MOI 1
	MOI 0,1	MOI 1	
Viabilidade MTT	↓↓↓	↓	MOI 0,1 < MOI 1
Apoptose	↑	NA	MOI 0,1 > MOI 1
Necrose	NA	NA	NA
Caspase-3	NA	NA	NA
LC3	↑	↑	NA
mTor	NA	NA	NA
Marcação Zika	---	---	MOI 0,1 > MOI 1
IL-2	NA	NA	NA
IL-4	NA	NA	NA
IL-6	↑	↑↑↑	MOI 0,1 < MOI 1
IL-10	↑	↑	NA
IL-12	NA	↑	NA
IL-17	↑	↑↑	MOI 0,1 < MOI 1
IFN-γ	NA	↑↑	MOI 0,1 < MOI 1
TNF	↑	↑	NA
MCP-1	↑	↑↑	MOI 0,1 < MOI 1
Corpúsculo Lipídico	↑	NA	MOI 0,1 > MOI 1
EROS	↑	↑	NA
ERNs	↑	↓	MOI 0,1 > MOI 1

↑: houve aumento no parâmetro; ↓: houve diminuição no parâmetro; >: maior que; <: menor que; NA: parâmetro não alterou.

Tabela 3: Comparação dos resultados obtidos pelos grupos de células tratadas com diferentes concentrações da curcumina em relação às células no estado basal.

Experimentos	Em relação ao basal				
	0,31	0,62	1,25	2,5	5
Viabilidade MTT	↑	↑	NA	↑	NA
Apoptose	NA	NA	NA	NA	NA
Necrose	NA	NA	NA	NA	NA
Caspase-3	NA	NA	NA	NA	NA
LC3	↑	↑	NA	NA	NA
mTor	NA	NA	NA	NA	NA
Marcação Zika	---	---	---	---	---
IL-2	NA	NA	NA	NA	↓
IL-4	NA	NA	↓	NA	NA
IL-6	↑	NA	NA	NA	NA
IL-10	↑	NA	NA	NA	NA
IL-12	NA	NA	NA	NA	NA
IL-17	↑	NA	NA	NA	NA
IFN-γ	↑	NA	↓	NA	NA
TNF	NA	NA	↑↑	NA	NA
MCP-1	NA	NA	↑↑	NA	NA
Corpúsculo Lipídico	↑↑	↑↑	↑↑	↑	↑
EROS	↑	↑	↑	↑	↑
ERNs	↑	↑	↑	↑	↑

↑: houve aumento no parâmetro; ↓: houve diminuição no parâmetro; >: maior que; <: menor que; NA: parâmetro não alterou.

Tabela 4: Comparação dos resultados obtidos pelos grupos de células infectadas com 0,1 MOI de vírus Zika e tratadas com diferentes concentrações da curcumina em relação às células infectadas com 0,1 MOI de vírus que não receberam o mesmo tratamento.

Experimentos	Em relação à célula infectada (MOI 0,1)				
	0,31	0,62	1,25	2,5	5
Viabilidade MTT	↑	↑	↑	↑	↑
Caspase-3	↓	↓	↓	NA	NA
Marcação Zika	NA	NA	NA	NA	NA
LC3	NA	NA	NA	NA	NA
mTor	NA	NA	NA	↓	↓
Vírus Zika	NA	NA	NA	NA	NA
IL-2	NA	↑	NA	↓	↓
IL-4	NA	NA	NA	NA	↓
IL-6	NA	NA	↑	NA	↓
IL-10	↑	NA	NA	↓	↓
IL-12	NA	NA	NA	NA	NA
IL-17	NA	NA	NA	↓	NA
IFN-γ	NA	NA	NA	NA	↓
TNF	↓	↓	NA	NA	↓
MCP-1	↑	↑	↑	NA	NA
Corpúsculo Lipídico	↑↑	↑↑	↑↑	↑	↑
EROS	↓	NA	NA	NA	NA
ERNs	NA	NA	NA	NA	NA

↑: houve aumento no parâmetro; ↓: houve diminuição no parâmetro; >: maior que; <: menor que; NA: parâmetro não alterou.

Tabela 5: Comparação dos resultados obtidos pelos grupos de células infectadas com 1 MOI de vírus Zika e tratadas com diferentes concentrações da curcumina em relação às células infectadas com 1 MOI de vírus que não receberam o mesmo tratamento.

Experimentos	Em relação à célula infectada (MOI 1)				
	0,31	0,62	1,25	2,5	5
Viabilidade MTT	↑	↑	↑	NA	↓
Apoptose	NA	NA	NA	NA	NA
Necrose	NA	↑	NA	NA	↑
Caspase-3	↓	↓	↓	↓	NA
LC3	NA	NA	↑	NA	↑
mTor	NA	↓	↓	↓	↓
Vírus Zika	NA	NA	↓	NA	↑
IL-2	NA	NA	NA	↓	↓
IL-4	NA	NA	↓	NA	NA
IL-6	↓	NA	NA	NA	NA
IL-10	NA	↓	NA	NA	↓
IL-12	NA	NA	NA	NA	NA
IL-17	NA	NA	NA	NA	↓
IFN-γ	↓	↓	NA	↓	↓
TNF	NA	↑	↓	↑	↑
MCP-1	NA	NA	NA	↑	↑
Corpúsculo Lipídico	↑↑	↑↑	↑↑	↑	↑
EROS	↑	↑	↑	↑	↑
ERNs	↑	↑	↑	NA	NA

↑: houve aumento no parâmetro; ↓: houve diminuição no parâmetro; >: maior que; <: menor que; NA: parâmetro não alterou.

DISCUSSÃO

Este trabalho mostrou pela primeira vez que a curcumina tem a capacidade de proteger e modular a resposta imune de micróglias contra a infecção pelo vírus Zika. Também foi possível demonstrar o efeito do vírus sobre as micróglias, células importantes na defesa contra microrganismos em um sítio privilegiado que é o SNC. Por este estudo, pode-se observar que o Zika tem efeito citopático, causando a morte por apoptose e estimulando a resposta inflamatória.

Segundo os dados, a presença do vírus Zika na cultura de micróglias BV2 reduziu a viabilidade deste tipo celular, quando analisamos pelo teste de redução do MTT. Estes dados sugerem que as micróglias são permissivas para a infecção com o vírus Zika, provavelmente contribuindo nos processos inflamatórios que ocorrem no sistema nervoso central durante a infecção com o ZIKV. A susceptibilidade de infecção da micróglia BV2 pelo vírus Zika havia sido descrita por Chan e colaboradores (2016). Neste trabalho foi descrito que algumas linhagens celulares de camundongos, como as micróglias BV2 e fibroblastos embrionários 3T3, apresentam níveis de replicação viral; porém, quando comparado com células de rim de macaco (LLC-MK2 e Células Vero), esta replicação foi baixa. Isso também foi observado por Oliveira (2019). Segundo o autor, as linhagens africana e asiática do ZIKV são capazes de infectar as micróglias BV2. Por meio de análise de RT-qPCR do lisado celular e do sobrenadante das culturas, os autores observaram que o vírus estava presente tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular, mostrando que o vírus foi capaz de se replicar e de ser liberado pelas células. Além disso, o ensaio de unificador formadoras de placa (PFU) com o sobrenadante mostrou que o vírus liberado é viável e capaz de infectar outros tipos celulares.

A redução observada em nossos experimentos ocorreu nas 24 horas após a infecção. O mesmo foi observado por Olmo e colaboradores (2017) ao avaliarem a curva de infecção no homogenato de cérebro de embriões murinos. O início das mortes celulares ocorreu no tempo de 12 horas após a infecção (HPI), com o pico no tempo de 24 HPI, momento em que também foi observado a maior produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β .

Após este momento, a morte celular se estabilizou, provavelmente em função da resposta inflamatória ativada para o controle da replicação viral. Adicionalmente, relatos demonstraram que as cepas africana e asiática do ZIKV não foram capazes de diminuir a viabilidade celular das micróglias BV2 quando analisadas no tempo de 48 e 72 HPI (Oliveira, 2019 e Freire, 2019). Embora não tenhamos avaliado a viabilidade das células infectadas nos tempos de 48 e 72 HPI, nossos dados encontram-se de acordo com a literatura e provavelmente o aumento de TNF também observado nas 24 horas de infecção possa ser um mecanismo importante tanto na defesa contra o vírus Zika quanto pode ser um mecanismo que responda pela diminuição da viabilidade, uma vez que o TNF é capaz de induzir a morte celular programada.

A redução da viabilidade pelo MTT foi observada tanto em uma condição com baixa quantidade de vírus quanto com uma alta quantidade. De forma interessante, observamos que a morte de células foi maior no MOI 0,1 em que a quantidade de vírus por células é menor em relação ao MOI 1. Essa diferença não foi bem caracterizada na literatura; porém em um estudo que avaliou a diferença biológica entre isolados do vírus Zika de diferentes regiões do Brasil, foi demonstrado que algumas linhagens de células imortalizadas de mamíferos quando expostas ao MOI 0,1 do Zika, apresentam um número maior de células infectadas após 24 e 48 horas na presença do vírus, quando comparado com as mesmas linhagens celulares expostas ao MOI 1, indicando que diferentes cargas virais podem resultar em cinéticas de infecções diferentes (Strottmann e cols, 2019). Possivelmente nosso resultado pode estar relacionado a dois fatores: a) A taxa e as características de replicação viral são diferentes entre os MOIs. A infecção com o menor MOI permite duas rotas de liberação da célula infectada, diferente do MOI 1 que apresenta uma cinética de etapa única, conforme modelo matemático descrito por Bernhauerová e cols (2020). Isso possivelmente, provoca um maior dano na membrana das células devido a saída dos vírus em maior quantidade no caso do MOI 0,1. b) Pelo nossos estudos, a resposta antiviral é mais tênue com

menor produção de citocinas inflamatórias o que causaria menor ativação das micróglias; conseqüentemente, menor capacidade de estimular a resposta inata intracelular, permitindo um menor controle da replicação viral, maior permissividade celular e um efeito citopático maior, haja visto que somente no MOI 0,1 foi observado um aumento da apoptose.

Conforme descrito anteriormente, ao compararmos o comportamento das micróglias BV2 quando desafiadas com diferentes multiplicidades de infecção, observamos a diferença no padrão de morte celular pelas BV2. Segundo os nossos dados avaliados pela marcação com anexina/PI, a quantidade de células em morte por apoptose foi maior no grupo infectado com MOI 0,1 do vírus Zika, quando comparado com o grupo de células na presença de MOI 1. Em função deste resultado, avaliamos se a apoptose poderia ser resultado da ativação da via das caspases; portanto, utilizamos a marcação com caspase 3, uma proteína comum na via de ativação da apoptose mediada por ativação via receptores de membrana (via extrínseca) ou pela ativação via alteração da funcionalidade mitocondrial (via intrínseca). Embora, a apoptose por aumento de caspase 3 tenha sido relatada em células de fígado humano da linhagem Huh-7 (Vanwalscappel et al, 2020) e em neurônios primários (Olmo et al, 2017) infectados pelo Zika, não constatamos aumento de ativação desta via nas células infectadas. Esses dados sugerem que a apoptose via caspase possa estar relacionado com o tipo celular e ainda que na micróglio BV2 possivelmente outra via de morte celular foi induzida.

De fato, o trabalho desenvolvido por Yang e colaboradores (2020) demonstrou que a morte celular pode ocorrer de forma independente da ativação das caspases. Nesse trabalho, foram analisadas células de glioblastoma humano na presença do ZIKV. Eles observaram que a morte celular estava relacionada também com a fragmentação das mitocôndrias e que este evento ocorre mesmo na presença de inibidores da caspase-3 e caspase-7. Porém, o número de células mortas foi menor na presença destes inibidores, indicando que diferentes vias são importantes no processo de morte celular na infecção pelo vírus Zika. Portanto, os nossos dados

corroboram para a hipótese de que a ativação da apoptose pode ocorrer independente do aumento da caspase-3 na infecção pelo Zika. Além disso, os dados obtidos por Yang e colaboradores sugerem que a diminuição da viabilidade que observamos pela redução do metabolismo do MTT pode ser decorrente da fragmentação mitocondrial durante a infecção pelo ZIKV.

É possível que neste contexto, o aumento da atividade autofágica observado pelo aumento de LC3 nas duas condições de infecção responda pela diminuição da viabilidade e pelo aumento da fosfatidilserina marcada pela anexina na membrana das micróglias infectadas. Embora a autofagia seja um mecanismo relacionado à renovação celular (Nikoletopoulou e cols, 2013), seu aumento pode conduzir também a apoptose e tem sido reportada durante infecções virais como forma de promover a degradação do vírus e aumentar a apresentação de antígenos pelas moléculas do MHC. Entretanto, alguns vírus utilizam o autofagossomo como um sítio de replicação e como local de evasão das respostas imunológicas (Gratton e cols, 2019). A apoptose que ocorre em função do aumento da autofagia se relaciona com aumento da proteína LGG1 que leva a exposição de fosfatidilserina na membrana da célula apoptótica (Jenzer e cols, 2019) e a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio dentre outros mecanismos. O aumento do estresse oxidativo estimula a expressão de proteínas ATGs envolvidas na formação do autofagossomo e despolarização da mitocôndria com liberação de proteínas pró-apoptóticas e ativação do mTOR (Rambold & Schwartz, 2011; Roca-Agujetas e cols, 2019).

A mTOR, conhecida também como receptor da rapamicina, controla a formação do autofagossomo e a degradação do seu conteúdo. Ela é regulada pela presença de nutrientes e de fatores de crescimento e é formada por dois complexos proteicos principais: o complexo TOR 1 (TORC1) e o complexo TOR 2 (TORC2), sendo que o primeiro está envolvido diretamente na inibição da autofagia por meio da inibição da fosforilação do complexo ULK, complexo proteico envolvido com o início da autofagia (Beltran, 2018). Portanto, o aumento da proteína mTOR representa a inibição do processo autofágico.

Entretanto, ao analisarmos a expressão da mTOR, uma proteína envolvida no controle do início da autofagia, não observamos diferença entre o grupo controle e o grupo infectado. Isso demonstra que o aumento da autofagia durante a infecção não parece estar na dependência da regulação via mTOR; contudo esse mecanismo deve ser melhor estudado.

Em relação ao LC3, embora tenhamos observado aumento de expressão nas células infectadas, não há na literatura um consenso sobre a função da autofagia durante a infecção pelo vírus Zika. De tal forma, que ainda não está estabelecido se a inibição ou ativação da autofagia impacta na replicação viral em células BV2. Por um lado, estudos com macrófagos de camundongo da linhagem RAW264.7 (Huang e cols, 2020) mostraram que o aumento da autofagia em fagócitos está relacionado com a melhora da capacidade fagocítica de vírus e proteínas virais. Isso foi confirmado utilizando inibidores das proteínas Atg5 e Atg7, essenciais para a indução da autofagia. Nessas condições, os pesquisadores observaram a perda de função fagocítica dos macrófagos durante a infecção com MOI 10 do vírus Zika, com uma expressiva redução do clearance viral (Huang e cols, 2020). Liu e colaboradores (2018) também observaram o acúmulo de LC3 em cortes histológicos de cérebro de drosófilas infectadas pelo vírus Zika, com acentuada redução da sobrevivência dos animais que receberam a administração de um inibidor da Atg5. Igualmente, Sahoo e colaboradores (2020), ao infectarem células precursoras neuronais de linhagem LUHMES, observaram uma rápida conversão do LC3-I em LC3-II e ao tratarem as células com a rapamicina, um indutor da autofagia, observaram uma redução dos níveis de proteína viral E no sobrenadante das culturas. Esses achados, em conjunto, podem indicar que a autofagia foi essencial para a defesa antiviral do hospedeiro.

Em contrapartida, em um estudo com células endoteliais humanas da linhagem HUVEC, Peng e colaboradores (2018) observaram que o aumento da expressão de LC3 ocorreu paralelamente ao aumento da proteína viral NS3, indicando que a autofagia decorreu em conjunto com a replicação do

vírus Zika. Ao realizarem o pré-tratamento das células com um inibidor da autofagia, os pesquisadores observaram uma queda significativa na replicação viral. Contudo, ao administrar a rapamicina, a replicação viral não foi aumentada. Isso também foi observado por Liang e colaboradores (2016), em um estudo com precursores neuronais. Segundo o trabalho, a infecção com MOI 0,01 do vírus Zika diminuiu a expressão da proteína mTOR, com conseqüente aumento da conversão de LC3-I para LC3-II. Segundo os autores, este seria um mecanismo importante para a replicação viral, já que ao analisarem células knockout para Atg3, uma proteína envolvida no complexo autofágico, a replicação viral foi cerca de sete vezes menor. Esses achados, em conjunto, indicam que o vírus Zika aproveita o complexo autofágico como um mecanismo de replicação.

Considerando a capacidade do vírus Zika de diminuir a viabilidade celular, aumentar a apoptose e a expressão de LC3, avaliamos se a curcumina seria capaz de modificar algum dos parâmetros estudados. Quando realizamos o tratamento das micróglias BV2 infectadas, observamos que a curcumina teve a capacidade de controlar alguns efeitos do vírus sobre as células.

Primeiro, ao analisar o teste de viabilidade pela redução do MTT, nossos dados mostraram que a curcumina em todas as concentrações testadas foi capaz de aumentar a viabilidade celular nos grupos de células na presença de MOI 0,1 do vírus Zika e nos grupos de células na presença de MOI 1 nos tratamentos com as concentrações 0,31 μM , 0,62 μM e 1,25 μM . Não está descrito na literatura por qual mecanismo a curcumina aumenta a viabilidade celular das micróglias BV2 durante a infecção. É possível que a curcumina tenha: a) promovido esse efeito diretamente sobre a replicação ou ligação dos vírus às células; b) indiretamente, modulando a resposta intracelular; ou c) alterando os mecanismos de resposta imune antiviral. Nossos resultados trazem evidências para tais hipóteses, uma vez que a curcumina, no tratamento das células infectadas com MOI 1, diminuiu a quantidade de vírus no tratamento com 1,25 μM , sendo essa diminuição

acompanhada pela diminuição da caspase 3, aumento de autofagia, diminuição de mTOR e uma maior modulação da produção de citocinas.

O efeito direto da curcumina diminuindo a quantidade do vírus Zika foi pouco estudado. Entretanto, Mounce e colaboradores (2017) ao investigarem o efeito da curcumina durante a infecção pelo ZIKV em células HeLa, observaram que este fármaco reduziu a replicação viral de forma dose-dependente nos grupos de células tratadas com concentrações da curcumina acima de 100 nM. Essa capacidade de interferir na replicação viral foi descrita para vários vírus (Jennings & Parks, 2020), inclusive para o vírus da Chikungunya (Mounce e cols, 2017) e para os sorotipos do vírus da Dengue (Gao e cols, 2019). O mecanismo proposto é interferência no mecanismo de ligação do Zika às membranas celulares da célula hospedeira, uma vez que é possível observar pela ressonância de superfície de plasma que a curcumina é capaz de se ligar à proteína E do vírus (Gao e cols, 2019), sendo esse efeito também observado para o vírus da hepatite C que tem a fluidez do envelope alterado pelo tratamento (Colpitts e cols, 2014).

Contudo, é importante ressaltar que nenhum efeito sobre a quantidade de vírus intracelular foi observado durante o tratamento com a curcumina na infecção com MOI 0,1 e adicionalmente, observamos uma maior quantidade de vírus no tratamento com 5 μ M durante as avaliações com MOI 1. Esses resultados com o MOI 0,1 podem em parte estar relacionados com o tempo de infecção utilizado (24 horas), em parte em relação com a capacidade infectiva do vírus utilizado e em parte com o tipo de célula infectada. Em 2019, um estudo avaliou 3 isolados de pacientes infectados em 2015/2016 e mais as cepas MR766 e PE243, demonstrando que os diferentes isolados apresentam diferenças nas taxas de infectividade, principalmente nas células de mamíferos, sendo que nas 24 horas de infecção a porcentagem de células infectadas é baixa, especialmente no MOI 0,1 (Strottmann e cols, 2019). Por outro lado, a quantidade de vírus pode ter aumentado no tratamento com 5 μ M decorrente das alterações na fisiologia celular que observamos durante este

tratamento, como o aumento da autofagia somado à redução da resposta inflamatória.

A melhora na viabilidade celular pelo teste de MTT foi um evento que observamos não somente no grupo de células infectadas com o vírus Zika, mas também nas células saudáveis que receberam o tratamento com a curcumina. Segundo os nossos dados, a curcumina nas concentrações 0,31 μM e 0,62 μM aumentaram o metabolismo do MTT pelas células BV2. Isso também foi observado por Lin e colaboradores (2019) ao avaliarem o efeito da curcumina sobre macrófagos da linhagem RAW264.7. Segundo os autores, este padrão de melhora na viabilidade celular durante o tratamento com as concentrações mais baixas da curcumina também se repetiu. Provavelmente, o efeito da curcumina sobre as micróglia não-infectadas em aumentar o metabolismo do MTT tenha ocorrido pela indução da biogênese de novas mitocôndrias. É descrito que a curcumina aumenta a expressão do fator de transcrição mitocondrial (TRAM) e do fator respiratório nuclear 1 (NRF-1), ambos envolvidos no processo de formação de novas mitocôndrias (Liu e cols, 2014), o que possivelmente está relacionado com o aumento do metabolismo do MTT.

A melhora da viabilidade celular observada nas células infectadas pelo Zika possivelmente ocorreu pela redução da apoptose. Nossos dados mostraram que a curcumina nas concentrações mais baixas foi capaz de reduzir a expressão de caspase-3 pelas micróglia BV2 na presença de MOI 0,1 e 1 do vírus. Este achado é o primeiro relato sobre a capacidade da curcumina em reduzir a sinalização da caspase-3 durante a infecção pelo vírus Zika. Anteriormente, este efeito só havia sido relatado em um estudo imunohistoquímico realizado em modelos de dano cerebral após isquemia em ratos tratados com curcumina uma hora após o dano tecidual (Li e cols, 2017). Esta redução foi relacionada com a regulação da via do NF- κB , uma via de transcrição gênica que controla a expressão de mediadores inflamatórios, como IL-1 β , IL-2 e IL-6, e que controla a expressão de moléculas relacionadas à apoptose, como a caspase-3. Portanto, um possível mecanismo para o

controle das mortes celulares no tratamento com a curcumina ocorreu pela inibição de vias inflamatórias e apoptóticas que estão relacionadas com a via do NF- κ B, culminando na redução da sinalização da caspase-3.

A curcumina também parece interferir no mecanismo de autofagia durante a infecção das micróglias BV2 pelo ZIKV. Os resultados mostraram que a curcumina aumentou a expressão de LC3 durante a infecção com a maior multiplicidade viral. Não há relatos desse efeito da curcumina durante a infecção pelo vírus Zika, mas de fato, a curcumina por si só tem mostrado alterar a função autofágica em diferentes modelos experimentais. Em modelos *in vivo*, o tratamento de camundongos com a curcumina aumentou o número de células positivas para LC3 (Gao e cols, 2016) e beclin-1 (Wang e cols, 2014) no cérebro. Já em modelos *in vitro*, o tratamento de macrófagos RAW264.7 (Paulino e cols, 2016) e de células de neuroblastoma humano de linhagem SH-SY5Y (Jaroonwichawan e cols, 2017) aumentou a expressão de LC3-II.

Paralelamente ao aumento de LC3 houve também a redução da expressão de mTOR pelas células sob as mesmas condições de infecção, indicando que a curcumina pode interferir na autofagia possivelmente pela modulação da mTOR. Um mecanismo que responde por esse efeito se refere à capacidade da curcumina de inibir a fosforilação da Akt, necessária à ativação do mTOR e inibição da autofagia, via desfosforilação dependente da fosfatase da proteína sensível à calicina A (Yu e cols, 2008). Essa interferência da curcumina diminuindo a mTOR deve desempenhar um papel importante na replicação viral. Embora o vírus Zika induza temporariamente e precocemente a autofagia (também observado pelo aumento de LC3 neste estudo) acumulando proteína viral em autofagossomos, em estágios posteriores da infecção, o Zika ativa a mTOR (Sahoo e cols, 2020). Entretanto, não está claro o papel da autofagia e do mTOR durante a infecção com o vírus Zika; porém, nossos dados trazem evidências de que a melhora promovida pelo tratamento com curcumina na viabilidade das células infectadas e na

diminuição da apoptose pode ser resultado do aumento da autofagia mediada pela modulação da mTOR.

É importante frisar que na relação vírus-hospedeiro, além dos fatores relacionados à virulência, tais como capacidade de replicação e ação citopática em determinada célula, outros fatores também desempenham um papel crucial no desenvolvimento de sinais e sintomas no hospedeiro, como é o caso da resposta imunitária acionada contra o vírus. Desta forma, este trabalho também avaliou a interação do vírus Zika com a micróglia, células importantes na resposta inata e no desenvolvimento de inflamação no SNC. Portanto, em relação à influência da infecção por vírus Zika sobre a responsividade das micróglias BV2, observamos que as células apresentaram um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , MCP-1, TNF- α e aumento no número de corpúsculos lipídicos. Não observamos alteração na produção de IL-2 e IL-4 pelas micróglias BV2. Já em relação à produção de espécies reativas de nitrogênio, observamos que as células expostas às menores quantidades de vírus apresentaram um aumento na produção de ERNs, enquanto as células expostas às maiores quantidades de vírus apresentaram redução desta produção.

Não há um consenso na literatura sobre o papel da ativação dos macrófagos e micróglias durante a infecção pelo vírus Zika, pois tanto o perfil de ativação M1, com aumento de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IFN- α/β e MCP-1, quanto o perfil M2 das micróglias, com aumento de IL-4, IL-10, IL-33 e TGF- β , parecem ter envolvimento nas complicações neurológicas desenvolvidas pelo vírus. O fato é que ambos os perfis, quando ativados exacerbadamente, podem promover o aumento da apoptose em neurônios, que ocorre pelo aumento de TNF- α ou IL-33, ativando a sinalização da caspase-3 (Rodrigues e cols, 2021).

O aumento das citocinas que observamos em nossos experimentos tem sido descrito em diferentes modelos experimentais. Isso foi visto por Wang e colaboradores (2018) em cultivo de micróglias primárias de

camundongo infectadas com o vírus Zika que produziram maior quantidade de TNF- α , IL-6 e IL-1 β em comparação ao grupo controle. Olmo e colaboradores (2017) também observaram o aumento de TNF- α e IL-1 β em homogenato de cérebro de camundongo infectado com o vírus Zika. Em células endoteliais de cérebro de camundongos, Papa e colaboradores (2017) observaram que o vírus Zika induz o aumento da produção de IL-6 e CCL5, indicando que o vírus induz o recrutamento de leucócitos para a barreira hematoencefálica, principalmente linfócitos.

Já em um estudo histopatológico realizado em cérebros de fetos humanos de gestações interrompidas por causa das complicações desenvolvidas pelo vírus Zika, não se observou um padrão de produção de citocinas igual entre os fetos; porém, houve um predomínio de citocinas inflamatórias como IL-6, MCP-1, TNF- α , IL-1 β e IL-18. Em um estudo semelhante, Azevedo e colaboradores (2018) observaram o aumento significativo na produção das citocinas IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IL-6, IL-12A, IL-1 β e TNF- α nos cérebros fetais. Também observaram a presença de IL-4, IL-10, IL-33, IL-37 e TGF- β , mas em menor quantidade. Em conjunto com os nossos dados, fica evidenciado que a resposta inflamatória é o padrão predominante na resposta contra o Zika, o que já era esperado para uma resposta antiviral.

Entretanto, observamos que a produção de citocinas inflamatórias foi muito maior na infecção utilizando o MOI 1, sendo que nem a IL-12 e nem o IFN- γ foram detectados após 24 horas na infecção com o MOI 0,1. Esse resultado já era esperado, uma vez que a quantidade de antígenos virais presentes no meio e infectando as micróglia é maior no MOI 1. Contudo, essa maior produção de citocinas na infecção com o MOI 1 não refletiu em maior aumento de apoptose; provavelmente, porque a produção de mediadores que podem levar à apoptose foi similar entre as duas condições. Por exemplo, não houve diferença entre os MOIs na produção de TNF que pode estimular a apoptose extrínseca via receptor (Wajant & Siegmund, 2019) e na produção de EROS que pode ativar a apoptose via intrínseca (Wu & Bratton, 2016). Por outro lado, a maior produção de citocinas com a presença de IFN- γ deve ter

melhorado a capacidade de resposta das micróglias contra o Zika, uma vez que a quantidade do vírus Zika foi menor no MOI 1 e conseqüentemente, isso deve ter refletido em uma perda de viabilidade menor quando comparado com o MOI 0,1.

Dentre as citocinas aumentadas durante a infecção, a IL-6, o TNF- α , o IFN- γ são importantes para a resposta de macrófagos, entre eles a micróglia. O TNF- α em sinergia com IFN- γ aumenta a capacidade fagocítica, a degradação do patógeno e a apresentação de antígenos (Olmo e cols, 2017; Maucourant e cols, 2019). Em conjunto com a produção de IL-12, que está aumentada nas células infectadas com o MOI 1, estas citocinas induzem a resposta adaptativa T auxiliar do tipo 1, importante para ativação de células TCD8 e células NK que tomam parte na resposta antiviral (Ray e cols, 2016). Em gestantes infectadas por Zika, o aumento dos linfócitos TCD8 circulantes ocorreu paralelamente à diminuição da carga viral e logo após o aumento de TNF- α , IFN- γ e IL-2 sérico, mostrando que a relação destas citocinas é primordial para a indução da resposta adaptativa específica contra o vírus (Tonerre e cols, 2020).

Por outro lado, a produção exacerbada de citocinas inflamatórias observada nos estudos nos chama a atenção para um possível papel da micróglia na morte de neurônios e alteração da neurogênese. De fato, em estudo anterior, o sobrenadante de cultura de micróglias infectadas com Zika e com níveis elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-6 inibiu a proliferação e a diferenciação de células progenitoras neuronais (Wang e cols, 2018). A excitotoxicidade que se caracteriza pelo constante aumento de Ca²⁺ intracelular, em neurônios, decorrente da liberação exacerbada de neurotransmissores é outro mecanismo de dano neuronal que pode estar associado com a hiperativação de micróglias durante a infecção por ZIKV. Este mecanismo ocorre em um microambiente com concentrações elevadas de TNF- α e IL-1 β que, em conjunto, estimulam a expressão de glutaminase, enzima responsável pela formação de glutamato. Isso promove o excesso de liberação de glutamato na fenda sináptica, resultando no influxo exacerbado

de Ca^{2+} em neurônios (Gulati e cols, 2016; Olmo e cols, 2017). Em conjunto com nossos resultados, esses relatos mostram a produção aumentada de citocinas inflamatórias pode responder pelo dano neurológico e na neuroinflamação causada pelo Zika.

A presença de IL-6 também foi observada nestes estudos. Além das suas ações na resposta imune, a IL-6 também desempenha um papel na neurogênese, controlando a proliferação e a diferenciação de células progenitoras de neurônios e de células da glia por meio da regulação da STAT-3 e da proteína de ligação ao AMPc (Erta e cols, 2012). No Zika, a IL-6 apresenta um importante papel no controle da replicação viral através da indução da produção de colesterol 25-hidroxilase, uma molécula que regula o influxo de colesterol nas células, diminuindo o colesterol intracelular necessário para a replicação viral (Magoro e cols, 2019). Em humanos, é visto que a infecção pelo ZIKV aumenta os níveis de IL-6 no sangue, sêmen e no leite materno (de Quental e cols, 2019).

Durante a infecção, é necessário que células fagocíticas adentrem os tecidos infectados para auxiliar no clearance dos vírus, das células infectadas e em morte. Para tal, é necessário que quimiocinas sejam produzidas e que recrutem os monócitos, que no SNC podem se transformar em micróglia. Nos nossos estudos, observamos que a produção de MCP-1 pelas micróglia BV2 aumentou durante a infecção. O aumento de MCP-1 também foi descrito em micróglia fetais (Lum e cols, 2017) e em células de Hofbauer (Quicke e cols, 2016). Entretanto, a MCP-1 pode estar relacionada também com a disseminação do vírus Zika para o sistema nervoso central, como descrito por Ayala-Nunez e colaboradores (2019). Segundo os autores, monócitos são susceptíveis para a infecção pelo Zika e o aumento na produção de MCP-1 pode ser usado pelo vírus como uma estratégia para aumentar o seu carreamento por meio dessas células até o SNC.

No nosso estudo observamos que a produção de IL-17 está aumentada na infecção, principalmente no MOI 1. Essa maior produção no MOI 1 pode

ser explicada em parte pela intensa produção de IL-6 nesta condição de infecção, já que esta é responsável pela indução do padrão Th17 em conjunto com as citocinas TGF- β e IL-21 (Tappe e cols, 2016). O aumento desta citocina foi observado em pacientes com infecção assintomática pelo vírus Zika, indicando que esta citocina pode estar associada com um bom prognóstico (Fares-Gusmão e cols, 2019). Por outro lado, embora não esteja claro a participação da IL-17 na neuroinflamação causada pelo ZIKA, é possível que a produção desta citocina desempenhe um papel no desenvolvimento da microcefalia, já que em estudos prévios foi observado que o aumento da IL-17 em camundongos gestantes induz alterações no desenvolvimento do SNC do feto (Estes & McAllister, 2016) e que em outras condições inflamatórias no SNC, o bloqueio dos receptores de IL-17 no cérebro reduz a ativação das micróglias, com melhora cognitiva nos camundongos analisados (Ye e cols, 2019).

Instigante foi observar que a IL-10 também foi estimulada durante a infecção das micróglias BV2 pelo Zika. A IL-10 é capaz de inibir o fator regulatório de interferons (IRF) e a via do NF- κ B, com consequente redução na produção de citocinas inflamatórias como o IFN- γ e o TNF- α , além de reduzir a expressão quimiocinas, moléculas de adesão e moléculas de MHC de classe II pelos macrófagos. Esta função da IL-10 é importante para o controle da ativação exacerbada dos fagócitos durante as infecções (Saraiva e cols, 2020). Em infecções virais, o aumento da IL-10 não está relacionado com o clearance viral, mas sim com a limitação das respostas imunológicas, controlando os possíveis danos teciduais desencadeados pela inflamação (Rojas e cols, 2017). Todavia, como descrito por Rojas e colaboradores (2017), a produção contínua de IL-10 pode comprometer a resposta antiviral do hospedeiro, contribuindo para a sobrevivência e disseminação do vírus, o que mostra que a regulação desta citocina deve ser bem controlada. Possivelmente, a micróglia possui um papel na regulação da resposta imunitária ao vírus. Contudo, esse papel parece controverso já que alguns trabalhos relatam nenhuma alteração nos níveis séricos de IL-10 em

pacientes infectados com o vírus (Nevasca e cols, 2018), enquanto outros relatam a redução desta citocina também em pacientes infectados (da Silva e cols, 2019).

Um possível sítio de estoque das citocinas que observamos estar aumentado durante a infecção são os corpúsculos lipídicos. Segundo os nossos dados, a formação de corpos lipídicos aumentou durante a infecção nas concentrações mais baixas do vírus no meio de cultura. Isso foi observado também por Chen e colaboradores (2020) ao analisarem células da placenta infectadas pelo vírus Zika, em função do aumento do influxo de ácidos graxos, ácido fosfatídico e diacilglicerol para o interior das células. A formação dos corpos lipídicos pode estar associada ao processo de autofagia em um processo conhecido como lipofagia. Na dengue esse mecanismo foi descrito pela observação de que proteínas virais NS4A e NS4B, que se ligam à proteína AUP1 do hospedeiro, promovendo a translocação dos corpos lipídicos para se fusionarem aos autofagossomas como forma de promover um sítio intracelular para montagem viral (Randall, 2018; Zhang e cols, 2018). Como em nossos experimentos observamos que o vírus Zika induz a formação do autofagossomo pelo aumento da LC3 e dos corpos lipídicos, nossos dados dão suporte para a hipótese de que o vírus Zika utilize de mecanismos parecidos como o vírus dengue para promover a própria replicação.

Considerando a resposta que foi estimulada pelo vírus Zika nas células BV2 e que a produção de mediadores inflamatórios pode estar envolvida na patogênese da doença, é possível que a curcumina, que tem ações anti-inflamatórias, melhore os mecanismos necessários ao controle da replicação viral sem, contudo, permitir a ativação exacerbada de uma resposta inflamatória. De maneira geral, a curcumina diminuiu a produção de citocinas, nas maiores concentrações e especialmente no MOI 0,1, com exceção da quimiocina MCP-1, que aumentou nas células infectadas e tratadas nas duas condições e o TNF, que aumentou no MOI 1. A produção de EROS e ERNS aumentou na condição com maior quantidade de vírus em todas as

concentrações e no MOI 0,1 praticamente não houve mudança na concentração de espécies reativas. Já a produção de corpúsculos lipídicos aumentou em todas as concentrações de tratamento e nas duas condições de infecção.

De todas as concentrações, o tratamento com 5 μM foi o que apresentou o resultado mais homogêneo, diminuindo a concentração de citocinas produzidas pelas células infectadas nas duas condições de infecção; mas, esse efeito parece já se estabelecer na concentração de 2,5 μM . Ainda não existem estudos avaliando o efeito da curcumina na produção de citocinas nas mesmas condições estudadas; porém, em alguns modelos de inflamação utilizando micróglia BV2 estimulada pelo LPS (Zhang e cols, 2019) ou pelo lisado eritrocitário (Yang e cols, 2014), observou-se que a curcumina em concentrações iguais e maiores que 5 μM reduziram a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , inclusive podendo polarizar a conversão da micróglia para o fenótipo não clássico M2. Existem diferentes perfis M2 em macrófagos e o subtipo M2c é induzido na presença de IL-10, que estimula uma resposta imunorreguladora nesta célula (Arora e cols, 2017; Liu e cols, 2014). É possível que isso também ocorra nas micróglia BV2 em situações em que o perfil de resposta seja menos inflamatório, já que observamos produção de IL-10 no tratamento com as doses baixas de curcumina tanto nas células não infectadas quanto nas infectadas com o MOI 0,1 no qual a produção de citocinas inflamatórias em resposta a infecção foi menor quando comparada com o MOI 1. Sugere-se que esta ação imunomoduladora da curcumina ocorra pela inibição da STAT-3, culminando em uma menor ativação da via do NF- κB , importante para produção de mediadores inflamatórios, inclusive o TNF (Bernardo e cols, 2021) e pela indução do PPAR- γ , que é importante no metabolismo lipídico e na formação de corpúsculos lipídicos no interior da célula e em mecanismos de regulação daquela via (Ghasemi e cols, 2019, Bernardo e cols, 2021; Xu e cols, 2003; Bozza e cols, 2009). É possível que a curcumina ative de forma diferente o PPAR- γ , a depender inclusive da dose do estímulo antigênico do Zika e da concentração do composto. Isso

responderia pela produção diminuída de várias citocinas e da produção diferenciada do TNF nas diferentes condições de infecção da micróglia que estudamos. Contudo é necessário o aprofundamento deste estudo.

Nossos resultados trazem evidências para esse aumento do metabolismo lipídico já que observamos que a curcumina teve a capacidade de aumentar a produção dos corpúsculos lipídicos pelas micróglias BV2 nas duas condições de infecção e também nas células não infectadas; porém, o aumento foi maior nas menores concentrações de tratamento. Esta característica da curcumina não havia sido descrita anteriormente durante a infecção pelo vírus Zika ou por outro flavivírus.

Interessante é que a BV2, embora seja um macrófago, é capaz de produzir IFN- γ (Orecchioni e cols, 2019; Mäkelä e cols, 2014; Kim & Nagai, 2010) e este foi uma das citocinas que diminuíram nas duas condições de infecção, enquanto a produção de TNF- α aumentou nos cultivos com a maior quantidade de vírus. O IFN- γ é reconhecidamente um dos maiores sinais de iniciação de macrófagos, mas não é capaz de por si só ativá-los, necessitando de uma ação sinérgica com o TNF ou com o reconhecimento dos patógenos via receptor para PAMPs (Mosser, 2003). Por outro lado, o reconhecimento de vírus pelos PRRs induz a ativação da via do NF- κ B importante para produção de TNF- α (Carty e cols, 2021). Portanto, é possível que o tratamento com 5 μ M tenha interferido na resposta adequada da micróglia contra o Zika, uma vez que observamos um aumento na quantidade de vírus no interior da célula nesta concentração. Adicionalmente, a maior quantidade de vírus sendo reconhecido pelas micróglias devem ter estimulado o aumento do TNF- α e EROS, que por sua vez, sem a regulação exercida pela IL-10 que está diminuída, devem se associar ao efeito citopático do vírus e responder pela queda da viabilidade, provavelmente causada por necrose e que está aumentada no estudo nesta concentração. De fato, observamos que independente da infecção, as maiores concentrações de curcumina são citotóxicas para as micróglias BV2.

Acrescenta-se que a dose de tratamento da curcumina influencia na indução dos efeitos anti-inflamatórios esperados, já que observamos que o tratamento altera a produção de citocinas a depender da concentração usada e do status inflamatório da resposta natural contra o vírus. As concentrações mais baixas da curcumina parecem não exercer um papel significativo direto na replicação viral, já que não observamos alteração da quantidade de vírus, mas foram as concentrações que mais aumentaram a viabilidade nas células infectadas. Provavelmente, isso ocorreu porque nestas concentrações, o perfil de resposta inflamatório e a produção de espécies reativas é mais regulado, melhorando a sobrevivência das células, contudo, sem estimular a produção de espécies microbicidas que auxiliariam no clearance dos vírus. Esse efeito pode ser reflexo de uma menor ativação das micróglias, haja visto que a produção de IL-10 pode estar aumentada, que o TNF- α está diminuído em vários grupos a depender do MOI e que praticamente a produção de IFN- γ e IL-12 não se alteraram. Por outro lado, conforme discutido anteriormente, as concentrações mais altas parecem ser mais citotóxicas, com um perfil de resposta inflamatória desregulado e grande produção de espécies reativas, agindo em conjunto com os vírus para a diminuição da viabilidade. Alguns estudos já relataram essa característica dose-dependente da curcumina e foram descritos e revisados por Ramirez e colaboradores (2017) e por Hewlings e colaboradores (2017).

Outra característica que observamos em nossos dados foi a influência da infecção pelo vírus Zika sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) pelas micróglias BV2. Estas são moléculas sinalizadoras importantes na resposta antiviral, produzidas majoritariamente por macrófagos estimulados por IFN- γ , TNF- α e IL-12 (Lisi e cols, 2021; Chaussen e cols, 2020; Chaturvedi & Nagar, 2009). São espécies reativas que interagem umas com os outros formando peroxidonitrito, trióxido nitrito e dióxido de nitrogênio, todas moléculas com características antivirais, mas que podem causar dano tecidual dependendo da concentração produzida (Lisi e cols, 2021; Chaussen e cols, 2020).

Segundo os nossos dados, a infecção com o vírus Zika induziu o aumento da produção de EROs pelas BV2 quando as células estavam na presença de MOI 0,1 e MOI 1; porém, para a produção de ERNs os resultados foram contrários nas duas condições de infecção, estando aumentado na infecção com a menor quantidade de vírus e diminuindo na maior. O aumento das espécies reativas na infecção já havia sido relatado em células U87-MG e HepG2 infectadas com o MOI 5 do vírus Zika, em função da diminuição da atividade da superóxido dismutase e catalase, enzimas presentes na via de detoxificação e pela inibição da Nrf2, fator de transcrição que regula a expressão de vários genes envolvidos com a resposta antioxidante (Almeida e cols, 2020). Já o aumento de ERNs foi observado em estudos com micróglia de camundongos recém-nascido infectadas com baixa quantidade do vírus Zika (MOI 0,2) (Wang e cols, 2018) e micróglia humanas CHME-5 infectadas com o MOI 1 (Diop e cols, 2018). Nos dois trabalhos, a produção de ERNs estava relacionada ao aumento da óxido nítrico sintase indutível (iNOS). Esses resultados mostram que a produção de ERNS está aumentada na infecção e que o fato de existir uma diminuição da produção de ERNS nos nossos cultivos deve ser melhor avaliado. É possível que isso seja uma característica da resposta da BV2 à infecção com maior quantidade de vírus ou ao maior consumo de arginina do meio necessária à produção de óxido nítrico.

Quando realizamos o tratamento das células BV2, observamos que em algumas condições experimentais a curcumina apresentou a característica pró-oxidante. Segundo os nossos dados, a curcumina nas concentrações mais baixas aumentou a produção de ERNs pelas células que estavam na presença de MOI 1 do vírus Zika. Em relação a produção de EROs, nossos dados mostraram que a curcumina apresentou uma característica indutora da produção desta espécie reativa pelas células que estavam na presença de MOI 1 do vírus. Essa ação pró-oxidante da curcumina foi observada também por Lin e colaboradores (2019) ao tratarem células RAW264.7 com diferentes concentrações da curcumina. Segundo os autores, o tratamento com

concentrações baixas deste fármaco resultou uma ação antioxidante, ao passo que o tratamento com concentrações elevadas da curcumina apresentou uma atividade pró-oxidante.

A curcumina é uma molécula que apresenta diversos alvos terapêutico, com diferentes afinidades por cada uma dessas moléculas (Larasati e cols, 2018). Em concentrações baixas, a curcumina consegue se ligar e estimular proteínas antioxidantes como a catalase, superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (Line e cols, 2019). Já em concentrações elevadas, a curcumina passa a ter a capacidade de se ligar e bloquear proteínas que estão envolvidas com o metabolismo das espécies reativas, como a carbonil redutase 1, glutathione transferase e a NADPH desidrogenase. Nestas condições, a curcumina assume um papel pró-oxidante (Larasati e cols, 2018), como observamos em nossos experimentos. Esta característica da curcumina pode ser favorável para o hospedeiro, por causa da inibição da replicação viral, como observado por Charnsilpa e colaboradores (2005) ao tratarem células infectadas pelo vírus dengue com uma molécula doadora de óxido nítrico. Segundo os autores, a replicação do vírus dengue reduziu de forma dose-dependente com a concentração de NO no meio. Entretanto, esta característica da curcumina precisa ser melhor investigada, pois a elevação dos níveis de EROs e ERNs no sistema nervoso central pode estar relacionado com a indução da morte de neurônios e neuroblastos (Lisi e cols, 2021).

De maneira geral, esse trabalho somou informações sobre a interação do vírus Zika com a micróglia, melhorando o entendimento sobre o impacto da infecção na sobrevivência das micróglias e possíveis mecanismos sobre a resposta imune desencadeada frente a infecção e possivelmente na neuroinflamação que ocorre durante a infecção. Pelo nosso trabalho, podemos mostrar que o Zika diminuiu a viabilidade de micróglias BV2, observado pela redução do metabolismo do MTT e pelo aumento do número de células em apoptose, sendo esta redução mais acentuada nos grupos de células que estavam em contato com MOI 0,1 do vírus Zika. Podemos mostrar

também que as micróglia respondem principalmente pelo aumento de mediadores inflamatórios como as espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio e pelas citocinas IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , MCP-1 e TNF- α , sendo esta resposta depende da carga viral utilizada.

Adicionalmente, este trabalho indica que a curcumina possui um papel antiviral e modulador da resposta das micróglia. Seu papel antiviral possivelmente decorre da sua capacidade de modular a autofagia pelos fagócitos, possivelmente por interferir na sinalização da proteína mTOR. Já o seu papel imunomodulador ocorreu em função do controle da produção das citocinas IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF- α . Contudo, essas ações da curcumina dependem muitas vezes da concentração do composto e da carga viral. Ademais, a curcumina protegeu as micróglia durante a infecção pelo vírus Zika, observado pela melhora do metabolismo do MTT e pela redução da expressão de caspase-3 pelas células.

CONCLUSÃO, LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Ao finalizar nossos estudos sobre a influência da infecção de micróglias pelo Zika e da curcumina na infecção, concluímos que:

- 1) A viabilidade está diminuída durante a infecção e depende da quantidade de vírus; porém, a curcumina é capaz de reverter esse efeito de forma dose-dependente, de tal forma que quanto menor a concentração do composto, melhor é o ganho na viabilidade. Isso sugere que a curcumina foi capaz de proteger as micróglias BV2 frente ao efeito citopático do vírus Zika;
- 2) A apoptose só foi evidente no grupo de células infectadas com a menor condição de infecção; contudo, a curcumina reduziu a expressão de caspase-3 pelas micróglias infectadas e isso parece estar relacionado com a melhora na viabilidade;
- 3) A autofagia foi induzida nas duas condições de infecção, porém, não houve envolvimento evidente de mTOR. A curcumina, por sua vez, manteve a expressão de LC3 aumentada, possivelmente por manter os níveis de mTOR reduzidos;
- 4) A presença do vírus no interior das micróglias pode ser observada, mostrando que estas células são permissivas a infecção; contudo, a quantidade de vírus é maior no MOI 0,1 do que no MOI 1, provavelmente porque a maior resposta inflamatória observada no MOI 1 estimulou os mecanismos celulares de defesa antiviral, podendo ter refletido em menor perda de viabilidade em relação ao MOI 0,1.
- 5) A curcumina não alterou a presença do vírus no interior das células infectadas com MOI 0,1, indicando que nesta condição, a melhora da viabilidade frente à infecção não ocorreu por uma ação antiviral do fármaco. Já no tratamento das células infectadas com MOI 1, a curcumina aumentou o número de células infectadas, quando estas tratadas com a maior concentração do fármaco, o que possivelmente ocorreu pela forte ação imunomoduladora da curcumina.

- 6) A infecção induziu a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, IL-17 e MCP-1, principalmente na presença de maior quantidade de antígenos virais. Já a produção de IL-2 e IL-4 não foi alterada pela infecção. Por sua vez, a curcumina foi capaz de modular a produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF- α pelas micróglias BV2, principalmente pelas células na presença de menor quantidade do vírus, mostrando a possível capacidade da curcumina em modular a neuroinflamação presente na infecção pelo Zika.
- 7) A produção de corpúsculos lipídicos está aumentada na infecção, provavelmente em função dos estímulos inflamatórios. Este aumento pode estar relacionado com o aumento da autofagia em um processo chamado de lipofagia; A curcumina, por sua vez, aumentou ainda mais a produção de corpos lipídicos pelas micróglias, provavelmente por meio do aumento de influxo de lipídios.
- 8) A produção de EROS está aumentada nas duas condições de infecção. Já a produção de ERNS está aumentada apenas no grupo de células na presença de MOI 0,1 e diminuída no grupo na presença de MOI 1 do vírus. O tratamento com a curcumina aumentou ainda mais a produção de EROS pelas BV2 nas duas condições de infecção e induziu a produção de ERNS pelas células na presença de MOI 1. Como nessas condições a curcumina promoveu uma melhora na viabilidade celular, nossos dados sugerem que o aumento na produção de espécies reativas foi importante na resposta antiviral pelas BV2.

Em conclusão, apesar de células murinas não representarem fielmente as alterações imunopatológicas da infecção pelo Zika em humanos, nosso trabalho contribuiu no entendimento de algumas alterações que ocorrem na fisiologia celular durante a interação vírus-hospedeiro. Este trabalho mostrou que há alterações na autofagia durante a infecção, contudo, devido ao curto prazo para conclusão deste trabalho e a pandemia, não podemos realizar os experimentos de perda e ganho de função pelo uso de inibidores e indutores

da autofagia para observar a importância deste mecanismo na replicação viral. Portanto, como perspectiva futura, seria interessante avaliar a replicação do vírus Zika em células infectadas na presença de inibidores e indutores da autofagia. Também não conseguimos estabelecer em tempo hábil o protocolo de ensaio de placa para quantificar o vírus presente no sobrenadante das culturas de BV2. Dessa forma, assim que estabelecido o protocolo, seria interessante avaliar o sobrenadante das culturas de BV2 em diferentes tempos de infecção para compreender melhor como é o ciclo de replicação viral neste modelo de estudo. Paralelamente, como perspectiva futura, também é interessante realizar as marcações para o vírus Zika para leitura em citometria de fluxo, com tempos anteriores e posteriores a 24 horas, adicionando também a quantificação do vírus por PCR, que não foi realizada no presente trabalho por causa das limitações de acesso aos laboratórios devido a pandemia.

REFERÊNCIAS

Almeida LT, Ferraz AC, da Silva Caetano CC, da Silva Menegatto MB, Dos Santos Pereira Andrade AC, Lima RLS, Camini FC, Pereira SH, da Silva Pereira KY, de Mello Silva B, Perucci LO, Talvani A, de Magalhães JC, de Brito Magalhães CL. Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities in vitro and in vivo. *Virus Res.* 2020 Sep;286:198084.

Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007 Nov-Dec;4(6):807-18.

Andrade DV, Harris E. Recent advances in understanding the adaptive immune response to Zika virus and the effect of previous flavivirus exposure. *Virus Res.* 2018 Aug 2;254:27-33.

Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology.* 2018 Apr-May;223(4-5):383-396.

Ayala-Nunez NV, Follain G, Delalande F, Hirschler A, Partiot E, Hale GL, Bollweg BC, Roels J, Chazal M, Bakoa F, Carocci M, Bourdoulous S, Faklaris O, Zaki SR, Eckly A, Uring-Lambert B, Doussau F, Cianferani S, Carapito C, Jacobs FMJ, Jouvenet N, Goetz JG, Gaudin R. Zika virus enhances monocyte adhesion and transmigration favoring viral dissemination to neural cells. *Nat Commun.* 2019 Sep 27;10(1):4430.

Azevedo RSS, de Sousa JR, Araujo MTF, Martins Filho AJ, de Alcantara BN, Araujo FMC, Queiroz MGL, Cruz ACR, Vasconcelos BHB, Chiang JO, Martins LC, Casseb LMN, da Silva EV, Carvalho VL, Vasconcelos BCB, Rodrigues

SG, Oliveira CS, Quaresma JAS, Vasconcelos PFC. In situ immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. *Sci Rep*. 2018 Jan 8;8(1):1.

Balasubramanian A, Pilankatta R, Teramoto T, Sajith AM, Nwulia E, Kulkarni A, Padmanabhan R. Inhibition of dengue virus by curcuminoids. *Antiviral Res*. 2019 Feb;162:71-78.

Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-83.

Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. *Lancet*. 2017 Nov 4;390(10107):2099-2109.

Bell TM, Field EJ, Narang HK. Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1971;35(2):183-93.

Beltran, Jackeline Soares de Oliveira. A participação da autofagia na regulação da célula-tronco hemopoética em camundongos knockouts para Atg7 e transglutaminase 2 [Tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2018.

Bernardo A, Plumitallo C, De Nuccio C, Visentin S, Minghetti L. Curcumin promotes oligodendrocyte differentiation and their protection against TNF- α through the activation of the nuclear receptor PPAR- γ . *Sci Rep*. 2021 Mar 2;11(1):4952.

Bernhauerová V, Rezelj VV, Vignuzzi M. Modelling Degradation and Replication Kinetics of the Zika Virus In Vitro Infection. *Viruses*. 2020 May 15;12(5):547.

Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill*. 2014 Apr 3;19(13):20751.

Borel S, Robert-Hebmann V, Alfaisal J, Jain A, Faure M, Espert L, Chaloin L, Paillart JC, Johansen T, Biard-Piechaczyk M. HIV-1 viral infectivity factor interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. *AIDS*. 2015 Jan 28;29(3):275-86.

Bozza PT, Bakker-Abreu I, Navarro-Xavier RA, Bandeira-Melo C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011 Nov;85(5):205-13.

Bozza PT, Bandeira-Melo C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Mar;100 Suppl 1:113-20.

Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1791(6):540-51.

Brasil. Boletim Epidemiológico – Febre pelo vírus Zika: uma revisão narrativa sobre a doença. [Online] 2015: [capturado em 2019, Dec 15] disponível em:

<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/26/2015-020-publica----o.pdf>

Brasil. Boletim Epidemiológico – Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, Chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas 1 a 46, 2020. [Online] 2020: [capturado em 2021, Feb 25] disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/11/boletim_epidemiologico_svs_48.pdf

Brasil. Boletim Epidemiológico – Monitoramento dos casos de dengue, febre Chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49 de 2018. [Online] 2018: [capturado em 2021, Feb 25] disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/02/2018-067.pdf>

Brasil. Boletim Epidemiológico – Síndrome Congênita Associada à Infecção pelo Vírus Zika. Situação epidemiológica, ações desenvolvidas e desafios de 2015 a 2019. [Online] 2019: [capturado em 2021, Mar 20] disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/05/be-sindrome-congenita-vfinal.pdf>

Brasil. Boletim Epidemiológico – Vigilância sentinela das doenças neuroinvasivas por arbovírus, Brasil, 2017 a 2019. [Online] 2020: [capturado em 2021, Mar 20] disponível em https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/novembro/13/boletim_epidemiologico_svs_44.pdf

Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2005 Aug;5(8):641-54.

Carneiro LA, Travassos LH. Autophagy and viral diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Microbes Infect.* 2016 Mar;18(3):169-71.

Carty M, Guy C, Bowie AG. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. *Biochem Pharmacol.* 2021 Jan;183:114316.

Chan JF, Yip CC, Tsang JO, Tee KM, Cai JP, Chik KK, Zhu Z, Chan CC, Choi GK, Sridhar S, Zhang AJ, Lu G, Chiu K, Lo AC, Tsao SW, Kok KH, Jin DY, Chan KH, Yuen KY. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg Microbes Infect.* 2016 Aug 24;5(8):e93.

Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun.* 2016 Apr; 68:1-13

Charnsilpa W, Takhampunya R, Endy TP, Mammen MP Jr, Libraty DH, Ubol S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. *J Med Virol.* 2005 Sep;77(1):89-95.

Chaturvedi UC, Nagar R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009 Jun;56(1):9-24.

Chausse B, Lewen A, Poschet G, Kann O. Selective inhibition of mitochondrial respiratory complexes controls the transition of microglia into a neurotoxic phenotype in situ. *Brain Behav Immun*. 2020 Aug;88:802-814.

Chen Q, Gouilly J, Ferrat YJ, Espino A, Glaziou Q, Cartron G, El Costa H, Al-Daccak R, Jabrane-Ferrat N. Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta. *Nat Commun*. 2020 Jun 11;11(1):2967.

Cheng D, Li W, Wang L, Lin T, Poiani G, Wassef A, Hudlikar R, Ondar P, Brunetti L, Kong AN. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and PKPD Modeling of Curcumin in Regulating Antioxidant and Epigenetic Gene Expression in Healthy Human Volunteers. *Mol Pharm*. 2019 May 6;16(5):1881-1889.

Coelho SVA, Neris RLS, Papa MP, Schnellrath LC, Meuren LM, Tschoeke DA, Leomil L, Verçoza BRF, Miranda M, Thompson FL, Da Poian AT, Souza TML, Carneiro FA, Damaso CR, Assunção-Miranda I, de Arruda LB. Development of standard methods for Zika virus propagation, titration, and purification. *J Virol Methods*. 2017 Aug;246:65-74.

Colpitts CC, Schang LM, Rachmawati H, Frentzen A, Pfaender S, Behrendt P, Brown RJ, Bankwitz D, Steinmann J, Ott M, Meuleman P, Rice CM, Ploss A, Pietschmann T, Steinmann E. Turmeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells. *Gut*. 2014 Jul;63(7):1137-49.

da Silva MHM, Moises RNC, Alves BEB, Pereira HWB, de Paiva AAP, Morais IC, Nascimento YM, Monteiro JD, de Souto JT, Nascimento MSL, de Araújo JMG, da Guedes PMM, Fernandes JV. Innate immune response in patients

with acute Zika virus infection. *Med Microbiol Immunol*. 2019 Dec;208(6):703-714.

de Quental OB, França EL, Honório-França AC, Morais TC, Daboin BEG, Bezerra IMP, Komninakis SV, de Abreu LC. Zika Virus Alters the Viscosity and Cytokines Profile in Human Colostrum. *J Immunol Res*. 2019 Nov 15;2019:9020519.

den Brok MH, Raaijmakers TK, Collado-Camps E, Adema GJ. Lipid Droplets as Immune Modulators in Myeloid Cells. *Trends Immunol*. 2018 May;39(5):380-392.

Deretic V, Levine B. Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy*. 2018;14(2):243-251.

Diop F, Vial T, Ferraris P, Wichit S, Bengue M, Hamel R, Talignani L, Liegeois F, Pompon J, Yssel H, Marti G, Missé D. Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. *PLoS One*. 2018 Oct 25;13(10):e0206093.

Dreux M, Chisari FV. Viruses and the autophagy machinery. *Cell Cycle*. 2010 Apr 1;9(7):1295-1307.

Duarte G, Moron AF, Timerman A, Fernandes CE, Mariani Neto C, Almeida Filho GL, Werner Junior H, Espírito Santo HFBD, Steibel JAP, Bortoletti Filho J, Andrade JBB, Burlá M, Silva de Sá MF, Busso NE, Giraldo PC, Moreira de Sá RA, Passini Junior R, Mattar R, Francisco RPV. Zika Virus Infection in

Pregnant Women and Microcephaly. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2017 May;39(5):235-248.

Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descloux E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet.* 2016 Mar 12;387(10023):1051

Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1254-66.

Estes ML, McAllister AK. IMMUNOLOGY. Maternal TH17 cells take a toll on baby's brain. *Science.* 2016 Feb 26;351(6276):919-20.

Fares-Gusmao R, Rocha BC, Sippert E, Lanteri MC, Áñez G, Rios M. Differential Pattern of Soluble Immune Markers in Asymptomatic Dengue, West Nile and Zika Virus Infections. *Sci Rep.* 2019 Nov 20;9(1):17172.

Forouzanfar F, Read MI, Barreto GE, Sahebkar A. Neuroprotective effects of curcumin through autophagy modulation. *IUBMB Life.* 2020 Apr;72(4):652-664.

Gao Y, Li J, Wu L, Zhou C, Wang Q, Li X, Zhou M, Wang H. Tetrahydrocurcumin provides neuroprotection in rats after traumatic brain injury: autophagy and the PI3K/AKT pathways as a potential mechanism. *J Surg Res.* 2016 Nov;206(1):67-76.

Gao Y, Tai W, Wang N, Li X, Jiang S, Debnath AK, Du L, Chen S. Identification of Novel Natural Products as Effective and Broad-Spectrum Anti-Zika Virus Inhibitors. *Viruses*. 2019 Nov 2;11(11):1019.

Ghasemi F, Bagheri H, Barreto GE, Read MI, Sahebkar A. Effects of Curcumin on Microglial Cells. *Neurotox Res*. 2019 Jul;36(1):12-26.

Glasner A, Oiknine-Djian E, Weisblum Y, Diab M, Panet A, Wolf DG, Mandelboim O. Zika Virus Escapes NK Cell Detection by Upregulating Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *J Virol*. 2017 Oct 27;91(22):e00785-17.

Gratton R, Agrelli A, Tricarico PM, Brandão L, Crovella S. Autophagy in Zika Virus Infection: A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 28;20(5):1048.

Guimarães SGP, Oliveira GMT, Guimarães CRM, Santos AMR, Dantas AFV. Efeitos no desenvolvimento de crianças expostas ao vírus zika no período fetal: revisão integrativa. *Rev. Bras. Enferm.* [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 24] ; 73(Suppl 4): e20190883. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672020001600307&lng=en.

Gulati K, Guhathakurta S, Joshi J, Rai N, Ray A (2016) Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunol* 4(2):00121.

Gutiérrez-Bugallo G, Piedra LA, Rodríguez M, Bisset JA, Lourenço-de-Oliveira R, Weaver SC, Vasilakis N, Vega-Rúa A. Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. *Nat Ecol Evol.* 2019 Apr;3(4):561-569.

Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Talignani L, Thomas F, Cao-Lormeau VM, Choumet V, Briant L, Desprès P, Amara A, Yssel H, Missé D. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol.* 2015 Sep;89(17):8880-96.

Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 2002 Nov;40(2):140-55.

Hasan SS, Sevana M, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol.* 2018 Jan;25(1):13-20.

He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009;43:67-93.

Heaton NS, Randall G. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe.* 2010 Nov 18;8(5):422-32.

Heinz FX, Stiasny K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017 Feb 8;81(1):e00055-16.

Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods*. 2017 Oct 22;6(10):92.

Huang L, Chen C, Zhang X, Li X, Chen Z, Yang C, Liang X, Zhu G, Xu Z. Neuroprotective Effect of Curcumin Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Via Mediating Autophagy and Inflammation. *J Mol Neurosci*. 2018 Jan;64(1):129-139.

Huang Y, Wang Y, Meng S, Chen Z, Kong H, Pan T, Lu G, Li X. Autophagy Contributes to Host Immunity and Protection against Zika Virus Infection via Type I IFN Signaling. *Mediators Inflamm*. 2020 Apr 28;2020:9527147.

Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000 Aug 1;50(3):184-95.

Jaroonwichawan T, Chaicharoenaudomrung N, Namkaew J, Noisa P. Curcumin attenuates paraquat-induced cell death in human neuroblastoma cells through modulating oxidative stress and autophagy. *Neurosci Lett*. 2017 Jan 1;636:40-47.

Jennings MR, Parks RJ. Curcumin as an Antiviral Agent. *Viruses*. 2020 Oct 31;12(11):1242. doi: 10.3390/v12111242.

Jenzer C, Simionato E, Largeau C, Scarcelli V, Lefebvre C, Legouis R. Autophagy mediates phosphatidylserine exposure and phagosome

degradation during apoptosis through specific functions of GABARAP/LGG-1 and LC3/LGG-2. *Autophagy*. 2019 Feb;15(2):228-241.

Joubert PE, Werneke SW, de la Calle C, Guivel-Benhassine F, Giodini A, Peduto L, Levine B, Schwartz O, Lenschow DJ, Albert ML. Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *J Exp Med*. 2012 May 7;209(5):1029-47.

Kasprzykowski JI, Fukutani KF, Fabio H, Fukutani ER, Costa LC, Andrade BB, Queiroz ATL. A recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there a risk of a new epidemic? *Int J Infect Dis*. 2020 Jul;96:579-581.

Kim SU, Nagai A. Microglia as immune effectors of the central nervous system: expression of cytokines and chemokines. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 2010 May (1)61-69.

Koppolu V, Shantha Raju T. Zika virus outbreak: a review of neurological complications, diagnosis, and treatment options. *J Neurovirol*. 2018 Jun;24(3):255-272.

Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules*. 2019 Aug 13;24(16):2930.

Kraychete DC, Calasans MTA, Valente CML. Citocinas pró-inflamatórias e dor. *Rev. Bras. Reumatol.* [Internet]. 2006 June [cited 2021 Mar 24]; 46(3): 199-206.

Krejbich-Trotot P, Gay B, Li-Pat-Yuen G, Hoarau JJ, Jaffar-Bandjee MC, Briant L, Gasque P, Denizot M. Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication. *Virology*. 2011 Sep 8;8:432.

Lai JK, Sam IC, Chan YF. The Autophagic Machinery in Enterovirus Infection. *Viruses*. 2016 Jan 27;8(2):32.

Larasati YA, Yoneda-Kato N, Nakamae I, Yokoyama T, Meiyanto E, Kato JY. Curcumin targets multiple enzymes involved in the ROS metabolic pathway to suppress tumor cell growth. *Sci Rep*. 2018 Feb 1;8(1):2039.

Lee YR, Lei HY, Liu MT, Wang JR, Chen SH, Jiang-Shieh YF, Lin YS, Yeh TM, Liu CC, Liu HS. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology*. 2008 May 10;374(2):240-8.

Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, Zhang N, Shi L, Qin CF, Xu Z. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell*. 2016 Jul 7;19(1):120-6.

Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava JA, Chai G, Sheets N, Tang W, Terskikh AV, Shresta S, Gleeson JG. Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell*. 2016 Nov 3;19(5):593-598.

Li W, Suwanwela NC, Patumraj S. Curcumin prevents reperfusion injury following ischemic stroke in rats via inhibition of NF- κ B, ICAM-1, MMP-9 and caspase-3 expression. *Mol Med Rep*. 2017 Oct;16(4):4710-4720.

Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo SS, Lee SA, Ge J, Wang S, Goldman SA, Zlokovic BV, Zhao Z, Jung JU. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell*. 2016 Nov 3;19(5):663-671.

Lin X, Bai D, Wei Z, Zhang Y, Huang Y, Deng H, Huang X. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. *PLoS One*. 2019 May 21;14(5):e0216711.

Lisi F, Zelikin AN, Chandrawati R. Nitric Oxide to Fight Viral Infections. *Adv Sci (Weinh)*. 2021 Feb 9;8(7):2003895.

Liu L, Zhang W, Wang L, Li Y, Tan B, Lu X, Deng Y, Zhang Y, Guo X, Mu J, Yu G. Curcumin prevents cerebral ischemia reperfusion injury via increase of mitochondrial biogenesis. *Neurochem Res*. 2014 Jul;39(7):1322-31.

Liu Y, Gordesky-Gold B, Leney-Greene M, Weinbren NL, Tudor M, Cherry S. Inflammation-Induced, STING-Dependent Autophagy Restricts Zika Virus Infection in the *Drosophila* Brain. *Cell Host Microbe*. 2018 Jul 11;24(1):57-68.e3.

Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci*. 2014 May 1;10(5):520-9.

Lum FM, Lee D, Chua TK, Tan JLL, Lee CYP, Liu X, Fang Y, Lee B, Yee WX, Rickett NY, Chia PY, Lim V, Leo YS, Matthews DA, Hiscox JA, Ng LFP. Zika Virus Infection Preferentially Counterbalances Human Peripheral Monocyte and/or NK Cell Activity. *mSphere*. 2018 Mar 28;3(2):e00120-18.

Lum FM, Low DK, Fan Y, Tan JJ, Lee B, Chan JK, Rénia L, Ginhoux F, Ng LF. Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces Inflammation. *Clin Infect Dis*. 2017 Apr 1;64(7):914-920.

Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An. Bras. Dermatol*. [Internet]. 2004 Dec [cited 2021 Mar 30]; 79(6): 647-662. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962004000600002&lng=en.

Magoro T, Dandekar A, Jennelle LT, Bajaj R, Lipkowitz G, Angelucci AR, Bessong PO, Hahn YS. IL-1 β /TNF- α /IL-6 inflammatory cytokines promote STAT1-dependent induction of CH25H in Zika virus-infected human macrophages. *J Biol Chem*. 2019 Oct 4;294(40):14591-14602.

Mäkelä J, Koivuniemi R, Korhonen L, Lindholm D. Interferon-gamma produced by microglia and the neuropeptide PACAP have opposite effects on the viability of neural progenitor cells. *PLoS One*. 2010 Jun 14;5(6):e11091.

Malta MJM, Vargas A, Leite PL, Jadher P, Coelho GE, Ferraro AHA. Síndrome de Guillain-Barré e outras manifestações neurológicas possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika em municípios da Bahia, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde* [Internet]. 2017 Mar [cited 2021 Mar 24]; 26(1): 9-18. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222017000100009&lng=en.

Maucourant C, Queiroz GAN, Samri A, Grassi MFR, Yssel H, Vieillard V. Zika virus in the eye of the cytokine storm. *Eur Cytokine Netw*. 2019 Sep 1;30(3):74-81.

Melo RC, Dvorak AM. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog*. 2012;8(7):e1002729.

Metz P, Chiramel A, Chatel-Chaix L, Alvisi G, Bankhead P, Mora-Rodriguez R, Long G, Hamacher-Brady A, Brady NR, Bartenschlager R. Dengue Virus Inhibition of Autophagic Flux and Dependency of Viral Replication on Proteasomal Degradation of the Autophagy Receptor p62. *J Virol*. 2015 Aug;89(15):8026-41.

Miner JJ, Diamond MS. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe*. 2017 Feb 8;21(2):134-142.

Mirzaei H, Shakeri A, Rashidi B, Jalili A, Banikazemi Z, Sahebkar A. Phytosomal curcumin: A review of pharmacokinetic, experimental and clinical studies. *Biomed Pharmacother*. 2017 Jan;85:102-112.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1069-75.

Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, Vesnaver Vipotnik T, Fabjan Vodusek V, Vizjak A, Pižem J, Petrovec M, Avšič Županc T. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*. 2016 Mar 10;374(10):951-8.

Mohamed MR, McFadden G. NFkB inhibitors: strategies from poxviruses. *Cell Cycle*. 2009 Oct 1;8(19):3125-32.

Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res*. 2011 Jan;21(1):103-15.

Morrey JD, Oliveira ALR, Wang H, Zukor K, de Castro MV, Siddharthan V. Zika virus infection causes temporary paralysis in adult mice with motor neuron synaptic retraction and evidence for proximal peripheral neuropathy. *Sci Rep*. 2019 Dec 20;9(1):19531.

Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2003 Feb;73(2):209-12.

Mosser CA, Baptista S, Arnoux I, Audinat E. Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Prog Neurobiol*. 2017 Feb-Mar;149-150:1-20.

Mounce BC, Cesaro T, Carrau L, Vallet T, Vignuzzi M. Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. *Antiviral Res.* 2017 Jun;142:148-157.

Muniz-Junqueira MI, dos Santos-Neto LL, Tosta CE. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro. *Cell Immunol.* 2001 Mar 15;208(2):73-9.

Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 2015 Feb;21(2):359-61.

Nabila N, Suada NK, Denis D, Yohan B, Adi AC, Veterini AS, Anindya AL, Sasmono RT, Rachmawati H. Antiviral Action of Curcumin Encapsulated in Nanoemulsion against Four Serotypes of Dengue Virus. *Pharm Nanotechnol.* 2020;8(1):54-62.

Nardacci R, Amendola A, Ciccocanti F, Corazzari M, Esposito V, Vlassi C, Taibi C, Fimia GM, Del Nonno F, Ippolito G, D'Offizi G, Piacentini M. Autophagy plays an important role in the containment of HIV-1 in nonprogressor-infected patients. *Autophagy.* 2014 Jul;10(7):1167-78.

Nem de Oliveira IS, Frost PS, França JV, Nascimento-Viana JB, Neris RLS, Freitas L, Pinheiro DJLL, Nogueira CO, Neves G, Chimelli L, De Felice FG, Cavalheiro ÉA, Ferreira ST, Assunção-Miranda I, Figueiredo CP, Da Poian AT, Clarke JR. Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice. *Sci Transl Med.* 2018 Jun 6;10(444):eaar2749.

Naveca FG, Pontes GS, Chang AY, Silva GAV, Nascimento VA, Monteiro DCS. Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2018; 113(6): e170542. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000600303&lng=en.

Ngono AE, Shresta S. Immune Response to Dengue and Zika. *Annu Rev Immunol.* 2018 Apr 26;36:279-308.

Nicola AM, Albuquerque P, Martinez LR, Dal-Rosso RA, Saylor C, De Jesus M, Nosanchuk JD, Casadevall A. Macrophage autophagy in immunity to *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2012 Sep;80(9):3065-76.

Nielsen-Saines K, Brasil P, Kerin T, Vasconcelos Z, Gabaglia CR, Damasceno L, Pone M, Abreu de Carvalho LM, Pone SM, Zin AA, Tsui I, Salles TRS, da Cunha DC, Costa RP, Malacarne J, Reis AB, Hasue RH, Aizawa CYP, Genovesi FF, Einspieler C, Marschik PB, Pereira JP, Gaw SL, Adachi K, Cherry JD, Xu Z, Cheng G, Moreira ME. Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children. *Nat Med.* 2019 Aug;25(8):1213-1217.

Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1833(12):3448-3459.

Nóbrega MEB, Araújo ELL, Wada MY, Leite PL, Dimech GS, Pércio J. Surto de síndrome de Guillain-Barré possivelmente relacionado à infecção prévia pelo vírus Zika, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde* [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar 24] ; 27(2): e2017039. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222018000200309&lng=en.

Olmo IG, Carvalho TG, Costa VV, Alves-Silva J, Ferrari CZ, Izidoro-Toledo TC, da Silva JF, Teixeira AL, Souza DG, Marques JT, Teixeira MM, Vieira LB, Ribeiro FM. Zika Virus Promotes Neuronal Cell Death in a Non-Cell Autonomous Manner by Triggering the Release of Neurotoxic Factors. *Front Immunol*. 2017 Aug 23;8:1016.

Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol*. 2019 May 24;10:1084.

Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, Burns D, Leib DA, Levine B. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe*. 2007 Mar 15;1(1):23-35.

Orvedahl A, Levine B. Autophagy and viral neurovirulence. *Cell Microbiol*. 2008 Sep;10(9):1747-56.

Padalko E, Ohnishi T, Matsushita K, Sun H, Fox-Talbot K, Bao C, Baldwin WM 3rd, Lowenstein CJ. Peroxynitrite inhibition of Coxsackievirus infection by

prevention of viral RNA entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 10;101(32):11731-6.

Padilla-S L, Rodríguez A, Gonzales MM, Gallego-G JC, Castaño-O JC. Inhibitory effects of curcumin on dengue virus type 2-infected cells in vitro. *Arch Virol*. 2014 Mar;159(3):573-9.

PAHO – Pan American Health Organization. Zika – Epidemiological Update. [Online] 2016: [capturado em 2020, Dec 15] disponível em <https://www.paho.org/en/documents/16-june-2016-zika-epidemiological-update>

Papa MP, Meuren LM, Coelho SVA, Lucas CGO, Mustafá YM, Lemos Matassoli F, Silveira PP, Frost PS, Pezzuto P, Ribeiro MR, Tanuri A, Nogueira ML, Campanati L, Bozza MT, Paula Neto HA, Pimentel-Coelho PM, Figueiredo CP, de Aguiar RS, de Arruda LB. Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. *Front Microbiol*. 2017 Dec 22;8:2557.

Patel SS, Acharya A, Ray RS, Agrawal R, Raghuwanshi R, Jain P. Cellular and molecular mechanisms of curcumin in prevention and treatment of disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(6):887-939.

Patiño-Barbosa AM, Medina I, Gil-Restrepo AF, Rodriguez-Morales AJ. Zika: another sexually transmitted infection? *Sex Transm Infect*. 2015 Aug;91(5):359.

Paulino N, Paulino AS, Diniz SN, de Mendonça S, Gonçalves ID, Faião Flores F, Santos RP, Rodrigues C, Pardi PC, Quincoces Suarez JA. Evaluation of the anti-inflammatory action of curcumin analog (DM1): Effect on iNOS and COX-2 gene expression and autophagy pathways.

Peng H, Liu B, Yves TD, He Y, Wang S, Tang H, Ren H, Zhao P, Qi Z, Qin Z. Zika Virus Induces Autophagy in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Viruses*. 2018 May 15;10(5):259.

Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan;8(1):49-62.

Perrone L, Squillaro T, Napolitano F, Terracciano C, Sampaolo S, Melone MAB. The Autophagy Signaling Pathway: A Potential Multifunctional Therapeutic Target of Curcumin in Neurological and Neuromuscular Diseases. *Nutrients*. 2019 Aug 13;11(8):1881.

Peters M. Actions of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology*. 1996 Apr;23(4):909-16.

Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. *N Engl J Med*. 2016 Apr 21;374(16):1552-63.

Pinto Junior VL, Luz K, Parreira R, Ferrinho P. Zika Virus: A Review to Clinicians. *Acta Med Port*. 2015 Nov-Dec;28(6):760-5.

Pitha PM. Innate antiviral response: role in HIV-1 infection. *Viruses*. 2011 Jul;3(7):1179-203.

Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB. Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnol Adv*. 2014 Nov 1;32(6):1053-64.

Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL, McDonald CE, Ma H, O'Neal JT, Rajakumar A, Wrammert J, Rimawi BH, Pulendran B, Schinazi RF, Chakraborty R, Suthar MS. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe*. 2016 Jul 13;20(1):83-90.

Rambold AS, Lippincott-Schwartz J. Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. *Cell Cycle*. 2011 Dec 1;10(23):4032-8.

Ramirez CN, Li W, Zhang C, Wu R, Su S, Wang C, Gao L, Yin R, Kong AN. In Vitro-In Vivo Dose Response of Ursolic Acid, Sulforaphane, PEITC, and Curcumin in Cancer Prevention. *AAPS J*. 2017 Dec 20;20(1):19.

Randall G. Lipid Droplet Metabolism during Dengue Virus Infection. *Trends Microbiol*. 2018 Aug;26(8):640-642.

Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*. 2011 Apr 24;(50):2597.

Roca-Agujetas V, de Dios C, Lestón L, Marí M, Morales A, Colell A. Recent Insights into the Mitochondrial Role in Autophagy and Its Regulation by Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Nov 4;2019:3809308.

Rocchi A, He C. Emerging roles of autophagy in metabolism and metabolic disorders. *Front Biol (Beijing)*. 2015 Apr;10(2):154-164.

Rodrigues de Sousa J, Azevedo RDS, Quaresma JAS, Vasconcelos PFDC. The innate immune response in Zika virus infection. *Rev Med Virol*. 2021 Mar;31(2):e2166.

Rojas JM, Avia M, Martín V, Sevilla N. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *J Immunol Res*. 2017;2017:6104054.

Sagnier S, Daussy CF, Borel S, Robert-Hebmann V, Faure M, Blanchet FP, Beaumelle B, Biard-Piechaczyk M, Espert L. Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *J Virol*. 2015 Jan;89(1):615-25.

Sahoo BR, Pattnaik A, Annamalai AS, Franco R, Pattnaik AK. Mechanistic Target of Rapamycin Signaling Activation Antagonizes Autophagy To Facilitate Zika Virus Replication. *J Virol*. 2020 Oct 27;94(22):e01575-20.

Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020 Jan 6;217(1):e20190418.

Schneider C, Gordon ON, Edwards RL, Luis PB. Degradation of Curcumin: From Mechanism to Biological Implications. *J Agric Food Chem*. 2015 Sep 9;63(35):7606-14.

Serman TM, Gack MU. Evasion of Innate and Intrinsic Antiviral Pathways by the Zika Virus. *Viruses*. 2019 Oct 22;11(10):970.

Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:453-70.

Shuaib W, Stanazai H, Abazid AG, Mattar AA. Re-Emergence of Zika Virus: A Review on Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Am J Med*. 2016 Aug;129(8):879.e7-879.e12.

Siebenlist U. NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. Madrid, Spain, July 7-10, 1996. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Feb 22;1332(1):R7-13.

Silva LM, Jung JU. Modulation of the autophagy pathway by human tumor viruses. *Semin Cancer Biol*. 2013 Oct;23(5):323-8.

Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018 Apr;120(3):159-167.

Strottmann DM, Zanluca C, Mosimann ALP, Koishi AC, Auwerter NC, Faoro H, Cataneo AHD, Kuczera D, Wowk PF, Bordignon J, Duarte Dos Santos CN. Genetic and biological characterisation of Zika virus isolates from different Brazilian regions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114:e190150.

Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Dec;36(12):2503-18.

Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarchi L, Rissland J, Ferreira DF, Jaenisch T, Gómez-Medina S, Günther S, Bartoloni A, Muñoz-Fontela C, Schmidt-Chanasit J. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol*. 2016 Jun;205(3):269-73.

Tonnerre P, Melgaço JG, Torres-Cornejo A, Pinto MA, Yue C, Blümel J, de Sousa PSF, de Mello VDM, Moran J, de Filippis AMB, Wolski D, Grifoni A, Sette A, Barouch DH, Hoogeveen RC, Baylis SA, Lauer GM, Lewis-Ximenez LL. Evolution of the innate and adaptive immune response in women with acute Zika virus infection. *Nat Microbiol*. 2020 Jan ;5(1):76-83.

Ubol S, Chareonsirisuthigul T, Kasisith J, Klungthong C. Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells. *Virology*. 2008 Jul 5; 376(2):290-6.

Vanwalscappel B, Haddad JG, Almokdad R, Decotter J, Gadea G, Desprès P. Zika M Oligopeptide ZAMP Confers Cell Death-Promoting Capability to a Soluble Tumor-Associated Antigen through Caspase-3/7 Activation. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 16; 21(24):9578.

Villamil-Gómez WE, González-Camargo O, Rodríguez-Ayubi J, Zapata-Serpa D, Rodríguez-Morales AJ. Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *J Infect Public Health*. 2016 Sep-Oct;9(5):684-6.

von Rhein C, Weidner T, Henß L, Martin J, Weber C, Sliva K, Schnierle BS. Curcumin and *Boswellia serrata* gum resin extract inhibit chikungunya and vesicular stomatitis virus infections in vitro. *Antiviral Res*. 2016 Jan;125:51-7.

Wait S, Chen DS. Towards the eradication of hepatitis B in Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci*. 2012 Jan;28(1):1-9.

Wajant H, Siegmund D. TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Front Cell Dev Biol*. 2019 May 29;7:91.

Wan HC, Melo RC, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J*. 2007 Jan;21(1):167-78.

Wang C, Zhang X, Teng Z, Zhang T, Li Y. Downregulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in curcumin-induced autophagy in APP/PS1 double transgenic mice. *Eur J Pharmacol*. 2014 Oct 5;740:312-20.

Wang J, Liu J, Zhou R, Ding X, Zhang Q, Zhang C, Li L. Zika virus infected primary microglia impairs NPCs proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Mar 4;497(2):619-625.

Wang Z, Wang P, An J. Zika virus and Zika fever. *Virology*. 2016 Apr;31(2):103-9.

Wu CC, Bratton SB. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Aug 20;19(6):546-58.

Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb;9(2):162-76.

Xu J, Fu Y, Chen A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to the inhibitory effects of curcumin on rat hepatic stellate cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Jul;285(1):G20-30.

Yang C, Ma X, Wang Z, Zeng X, Hu Z, Ye Z, Shen G. Curcumin induces apoptosis and protective autophagy in castration-resistant prostate cancer cells through iron chelation. *Drug Des Devel Ther*. 2017 Feb 14;11:431-439.

Yang S, Gorshkov K, Lee EM, Xu M, Cheng YS, Sun N, Soheilian F, de Val N, Ming G, Song H, Tang H, Zheng W. Zika Virus-Induced Neuronal Apoptosis via Increased Mitochondrial Fragmentation. *Front Microbiol*. 2020 Dec 23;11:598203.

Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):124-31.

Yang Z, Zhao T, Zou Y, Zhang JH, Feng H. Curcumin inhibits microglia inflammation and confers neuroprotection in intracerebral hemorrhage. *Immunol Lett.* 2014 Jul;160(1):89-95.

Ye B, Tao T, Zhao A, Wen L, He X, Liu Y, Fu Q, Mi W, Lou J. Blockade of IL-17A/IL-17R Pathway Protected Mice from Sepsis-Associated Encephalopathy by Inhibition of Microglia Activation. *Mediators Inflamm.* 2019 Oct 7;2019:8461725.

Ye M , Hu W , He M , Li C , Zhai S , Liu Z , Wang Y , Zhang H , Li C . Deep imaging for visualizing nitric oxide in lipid droplets: discovering the relationship between nitric oxide and resistance to cancer chemotherapy drugs. *Chem Commun (Camb).* 2020 Jun 11;56(46):6233-6236.

Yu S, Shen G, Khor TO, Kim JH, Kong AN. Curcumin inhibits Akt/mammalian target of rapamycin signaling through protein phosphatase-dependent mechanism. *Mol Cancer Ther.* 2008 Sep;7(9):2609-20.

Zhang HT, Chen GG, Hu BG, Zhang ZY, Yun JP, He ML, Lai PB. Hepatitis B virus x protein induces autophagy via activating death-associated protein kinase. *J Viral Hepat.* 2014;21(9):642-9.

Zhang I, Cui Y, Amiri A, Ding Y, Campbell RE, Maysinger D. Pharmacological inhibition of lipid droplet formation enhances the effectiveness of curcumin in glioblastoma. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016 Mar;100:66-76.

Zhang J, Lan Y, Li MY, Lamers MM, Fusade-Boyer M, Klemm E, Thiele C, Ashour J, Sanyal S. Flaviviruses Exploit the Lipid Droplet Protein AUP1 to Trigger Lipophagy and Drive Virus Production. *Cell Host Microbe*. 2018 Jun 13;23(6):819-831.

Zhang J, Zheng Y, Luo Y, Du Y, Zhang X, Fu J. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/ TLR4/ NF- κ B pathways in BV2 cells. *Mol Immunol*. 2019 Dec;116:29-37.

ANEXO DE REAGENTES

Albumina fetal bovina – cód. 05482 da Sigma-Aldrich© INC, lote STBH7471, Saint Louis – Missouri, EUA.

Aminoácido não-essenciais – cód. M7145 da Sigma-Aldrich© INC, lote RNBH1872, Saint Louis – Missouri, EUA.

Anticorpo anti-cabra (FITC) – cód. F7367 da Sigma-Aldrich© INC, lote 069M4807V, Saint Louis – Missouri, EUA.

Anticorpo anti-camundongo (FITC) – cód. ab97239 da Abcan plc., lote GR3177368-19.

Anticorpo anti-caspase 3 – cód. C8487 da Sigma-Aldrich© INC, lote 038M4802V, Saint Louis – Missouri, EUA.

Anticorpo anti-flavivírus – cód. ab214335 da Abcan plc., lote GR294671-13.

Anticorpo anti-LC3 – cód. L7543 da Sigma-Aldrich© INC, lote 048M4810V, Saint Louis – Missouri, EUA.

Anticorpo anti-mTOR (FITC) – cód. PLA0114 da Sigma-Aldrich© INC, lote 7, Saint Louis – Missouri, EUA.

Bicarbonato de sódio P.A. – cód. 306 da Vetec Química Fina LTDA, lote 1001431, Duque de Caxias – Rio de Janeiro, RJ.

Bodipy – cód. 493/503 da Invotrogen – Thermo Fischer Scientific INC, lote 649175, Carlsbad, California, EUA.

Cloreto de sódio P.A. – cód. 3132 da Vetec Química Fina LTDA, lote 1008736, Duque de Caxias – Rio de Janeiro, RJ.

Curcumina – cód. C1386 da Sigma-Aldrich© INC, lote MKCD2451, Saint Louis – Missouri, EUA.

DAF-FM diacetato – cód. D23843 da Invotrogen – Thermo Fischer Scientific INC, lote 1973361, Carlsbad, California, EUA.

DCF-DA – cód. V12883 da Invotrogen – Thermo Fischer Scientific INC, lote 649175, Carlsbad, California, EUA.

DMEM – meio de cultura acrescido de glicose, cód. D7777 da Sigma-Aldrich© INC, lote SLBR1169V, Saint Louis – Missouri, EUA.

FITC Anexin V/PI – cód. 556547 da BD Biosciences, New Jersey – EUA.

Fosfato de sódio BIB P.A. – cód. 00565 da Impex Reagentes Analíticos LTDA, lote 08081280-CA.

Fosfato de sódio MINOB P.A. – cód. 00566 da Impex Reagentes Analíticos LTDA, lote 24193-D.

Giemsa – coloração da Doles Reagentes, lote Giem 1121, Goiânia – Goiás, Brasil.

LPS – lipopolissacarídeo de Escherichia coli. L2880 da Sigma-Aldrich© INC, lote 114K4105, Saint Louis – Missouri, EUA.

NCTC 109 – meio de cultura, cód. N1140 da Sigma-Aldrich© INC, lote 8LBS2680V, Saint Louis – Missouri, EUA.

Nigrosina – N4754 da Sigma-Aldrich© INC, lote 72F-0286, Saint Louis – Missouri, EUA.

Penicilina/estreptomicina – cód. 15140122 da Gibco – Thermo Fischer Scientific INC, lote 2129299, Carlsbad, California, EUA.

PMA – 13-acetato forbol 12-miristato. P8139 da Sigma-Aldrich© INC, lote 42K1555, Saint Louis – Missouri, EUA.

Soro fetal bovino – cód. 12657-029 da Gibco – Thermo Fischer Scientific INC, lote 210540K, Carlsbad, California, EUA.