



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina - FM

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Potencial efeito neuroprotetor, imunomodulador e antiviral do ômega-3 (DHA) na  
infecção neuronal e microglial pelo vírus Zika**

**Heloísa Antoniella Braz de Melo**

**Brasília – DF**

**Junho/2021**



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina - FM

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Potencial efeito neuroprotetor, imunomodulador e antiviral do ômega-3 (DHA) na infecção neuronal e microglial pelo vírus Zika**

**Aluna: Heloísa Antoniella Braz de Melo**

Dissertação de Mestrado desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília.

**Orientadora: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães**

Brasília – DF

Junho/2021

Dedico a minha mãe Quézia e ao meu pai Jarmes, por tanto amor e dedicação.

Dedico ao meu amado irmão João Luiz.

Dedico ao meu companheiro de vida Diego.

Por fim, dedico a todas as pessoas que me amaram, apoiaram, torceram, cuidaram de mim ao longo desses anos, pois cada um contribuiu para que a minha vida fosse mais feliz a cada dia.

## **Agradecimentos**

A Deus por me dar forças e proteção a cada passo da minha vida.

À minha amiga e orientadora Kelly, por ser uma das pessoas mais empáticas e compreensivas que já conheci. Obrigada pelas oportunidades, por todos os conselhos e por acreditar em mim, especialmente nos momentos que nem eu mesma conseguia. Você sempre será uma grande inspiração, representando uma grande mulher na ciência. Um agradecimento especial aos nossos cafés, sempre repletos de risadas, acolhimento, amizade e confiança. E claro, obrigada por todas as cápsulas de café que eu tomei da sua cafeteira, prometo que até o fim do doutorado eu consigo repor.

À minha amiga Gabriella Heyn, por ser tão querida e companheira. Lembro que nos identificamos desde a primeira conversa que tivemos no laboratório, era pra acontecer. Agradeço também ao meu amigo Luís Corrêa, por ser um amigo tão leal e cuidadoso. Você tem toda minha admiração, carinho e torcida. Vocês dois foram essenciais para essa conquista, me apoiaram, me ajudaram e me deram muito suporte emocional. Espero reencontrá-los em breve.

À minha amiga Sabrina, com quem desenvolvi um laço de irmã, dentro e fora do laboratório. Eu só tenho a agradecer por tudo que me ensina diariamente. Seguiremos da graduação para a vida, com toda certeza. À minha amiga Raquel por ser tão acolhedora, companheira e leal. O laço de amizade e confiança foi construído ao longo desses anos trabalhando juntas, de forma leve, natural e especial. Aos meus amigos Igor Santos, Gabriel Pasquarelli e Gabriel Ribeiro por serem tão prestativos, cuidadosos e pelo suporte emocional que sempre me deram. É um prazer compartilhar a vida pessoal e acadêmica com vocês.

Aos alunos que me acompanham: Milena, Ramon, Débora, Luana e Augusto por serem exemplares e por todo o suporte experimental ao longo desses anos. Agradeço também ao meu colega e colaborador Rafael Corrêa por ter me acompanhado, ensinado e se dedicado tanto aos nossos trabalhos. Aos meus amigos e colegas do LIMI que me ajudaram ao longo dessa jornada: Ana Rebouças, Nathalia, Dalila, Juliana, Luiz Eduardo, Gabriel Calixto, Tiago. Agradeço igualmente aos ex-integrantes do LIMI: Livia, Gabriel Henrique, Ravena, Tiago Furquim, Isabela Cardoso, Lucas Brandão e Luis Felipe.

Aos meus amigos da Biotecnologia pela sorte imensa de ter vivido quatro lindos anos com vocês. Um agradecimento especial a Carol Orlandi, Giovanna Gobbo e Gabriel Freire por desde o início terem me acolhido quando eu não conhecia nada de Brasília e por terem cuidado de mim como se fosse da família. À minha amiga/irmã Isis Avon e ao Flávio pelo laço de carinho e confiança que criamos ao longo desses anos. Ao Alessandro por tudo que vivemos na república e pelo suporte emocional imenso em momentos que eu mais precisei. À Bárbara e Jade pela amizade leal, por me entenderem e pelo carinho de sempre.

Às minhas amigas de longa data Gabriela, Bruna, Michelly, Adrieny e Laila por serem um dos maiores presentes de Deus na minha vida. Obrigada por toda a nossa história de lealdade, amor e felicidade ao longo desses 10 anos (ou mais). Vocês são sinônimo de felicidade para mim.

À minha mãe Quézia, meu pai Jarmes e meu irmão João Luiz por serem a mais pura e verdadeira definição de amor na minha vida. Toda a força que eu precisei nos dias mais difíceis veio diretamente deles. Agradeço pela confiança e por sonharem isso comigo, pois a conquista é toda nossa, nós chegamos até aqui juntos. Obrigada por me ensinarem a dar valor as oportunidades e seguir com determinação. Vocês são a minha inspiração de vida. E lembrem-se sempre: Se tu vens, por exemplo, às quatro da tarde, desde as três eu começarei a ser feliz.

A toda a minha família, em especial minha Tia Simone (segunda mãe) e Tio Raimundo por toda ajuda, carinho e apoio desde o início, quando eu ainda sonhava em ser Biotecnologista. Ao meu Tio Waley e Wederson por terem sido as melhores companhias que eu poderia ter durante os anos da minha graduação. Ao Rodrigo por toda a torcida, suporte, carinho e apoio. À minha avó Maria pelo amor incondicional pelo papel fundamental que teve na minha vida e na minha criação. À minha avó Conceição e meu avô Belchior por terem cuidado tanto de mim, desde que me entendo por gente.

Ao meu namorado Diego que desde o momento que nos conhecemos, foi extremamente companheiro e cuidadoso. Obrigada por tudo que compartilhamos e estamos construindo juntos. Obrigada também pela oportunidade de conhecer e fazer parte da sua família, que me recebeu com um carinho imensurável. Obrigada especial a

Dona Cristina, por ser um exemplo de força e de amor. E, claro, agradeço às minhas amigas Bruna e Marilha que trouxeram muita luz e cor a minha vida.

Aos meus colaboradores externos ao laboratório pelas contribuições essenciais para esse trabalho: Prof. Dr. Thomas Williams, Paulo Prado (LACEN-DF) e Profa. Dra. Andreza de Bem.

A Universidade de Brasília (UnB), minha segunda casa, por ter me proporcionado a experiência de graduação e pós-graduação com profissionais de excelência. Aos técnicos da UnB, em especial o Chiquinho, por nos ajudar sempre que precisamos. Aos servidores da UnB que desempenham seu papel com excelência, em especial aos servidores da secretaria da Patologia Molecular, por todo o auxílio ao longo desses dois anos. Agradeço também ao coordenador do curso de pós-graduação da Patologia Molecular, Prof. Dr. Sébastien Charneau, por se disponibilizar sempre em nos ajudar quando necessário.

Por fim, as agências de fomento CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1. Vírus Zika.....	13
1.2. Características clínicas da infecção por ZIKV .....	15
1.3. Impacto da infecção por ZIKV na morte, proliferação e diferenciação de células neurais .....	17
1.4. Neuroinflamação .....	18
1.5. Os ácidos graxos poli-insaturados de ômega-3 .....	21
1.6. Efeito neuroprotetor e anti-inflamatório do DHA.....	23
<b>2. Justificativa</b> .....	26
<b>3. Objetivos</b> .....	27
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
<b>4. Metodologia</b> .....	28
4.1. Preparo das células, pré-tratamento e infecções.....	28
4.2. Análises de viabilidade e morte celular.....	31
4.3. Análise de Proliferação e Ciclo celular .....	32
4.4. Análise da função mitocondrial e estresse oxidativo .....	33
4.5. Análise do Perfil Inflamatório.....	34
4.6. Análise do Perfil Metabólico.....	36
4.7. Análise de carga viral.....	37
4.8. Análises Estatísticas .....	39
<b>5. Resultados</b> .....	39
5.1. O DHA protege contra a morte celular causada pelo ZIKV em células de neurônios humanos .....	39
5.2. DHA aumenta a capacidade proliferativa de células neuronais infectadas com ZIKV .....	42
5.3. DHA previne a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo causado pelo ZIKV em células neuronais.....	44
5.4. DHA ameniza a resposta pró-inflamatória induzida pelo ZIKV em células neuronais .....	48
5.5. O DHA protege contra o aumento de viabilidade e proliferação celular da micróglia humana.....	50
5.6. O DHA reduz a biogênese de corpúsculos lipídicos e formação de espécies reativas durante a infecção do ZIKV na micróglia .....	54

5.8.	O DHA modula o perfil de apresentação de antígenos lipídicos e peptídicos da micróglia.....	59
5.9.	O pré-tratamento com DHA e a infecção pelo ZIKV modulam moléculas regulatórias na superfície de micróglia.....	62
5.10.	Modulação da função mitocondrial pelo ZIKV e tratamento com DHA na micróglia.....	64
5.11.	Os intermediários do ciclo do ácido cítrico são modulados durante a infecção do ZIKV e tratamento com DHA .....	67
5.12.	O ZIKV e DHA modulam o perfil metabólico global da micróglia.....	69
5.13.	O DHA reduz a carga viral do ZIKV em células neuronais e microgliais	74
<b>6.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>86</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>87</b>
<b>9.</b>	<b>Artigos e capítulos de livros publicados durante o mestrado.....</b>	<b>107</b>

## **Potencial efeito neuroprotetor, imunomodulador e anti-viral do ômega-3 (DHA) na infecção neuronal e microglial pelo vírus Zika**

Heloísa Antoniella Braz de Melo

### **RESUMO**

O vírus Zika (ZIKV) possui um intenso tropismo por células neurais e tem sido correlacionado com o desenvolvimento agravos neurológicos pós-infecção. Além disso, a infecção por este vírus está associada ao estabelecimento de uma neuroinflamação intensa, sendo esta majoritariamente orquestrada por células microgliais. O impacto negativo da infecção pelo ZIKV no Sistema Nervoso Central (SNC) é amplamente caracterizado na literatura. Contudo, a aplicação de moléculas capazes de proteger contra os efeitos citotóxicos causados por este vírus ainda é necessária. Neste contexto, tem sido extensamente demonstrado que o Ácido Docosahexaenoico (DHA), um ácido-graxo poli-insaturado de ômega-3, é altamente neuroprotetor e desempenha diferentes funções essenciais para a homeostase do SNC. Portanto, neste trabalho, nós investigamos o papel protetor do DHA contra a patogênese do ZIKV em células SH-SY5Y, utilizadas como *neuronal-like cells*, e em células microgliais humanas. Nossos dados demonstraram que o pré-tratamento com DHA foi capaz de aumentar a viabilidade e proliferação de células SH-SY5Y infectadas com ZIKV, bem como de reduzir a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias produzidas durante a infecção. O DHA também foi capaz de restaurar a função mitocondrial e prevenir contra o estresse oxidativo que foram induzidos pelo ZIKV. Em células microgliais, o DHA reduziu a proliferação, biogênese de corpúsculos lipídicos, produção de espécies reativas e produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias durante a infecção do ZIKV. Além disso, o DHA modulou importantes marcadores de membrana associados à função regulatória e de apresentação de antígenos peptídicos e lipídicos pela micróglia. Investigando acerca de alterações metabólicas durante a infecção, demonstramos que tanto o ZIKV como o DHA modulam intermediários do ciclo do ácido cítrico e o perfil metabólico global da micróglia. Ademais, o DHA foi capaz de reduzir a carga viral tanto das células microgliais, quanto das neuronais. Em conjunto, esses dados demonstram que o DHA possui um potencial neuroprotetor, imunomodulador e antiviral, sendo uma molécula promissora para intervenções terapêuticas contra a infecção do ZIKV.

## **Potential neuroprotective, immunomodulatory and antiviral effects of omega-3 (DHA) in neuronal and microglial Zika virus infection**

Heloísa Antoniella Braz de Melo

### **ABSTRACT**

Zika virus (ZIKV) has a major tropism for neural cells and has been correlated with post-infection neurological syndromes. Furthermore, this viral infection can lead to the establishment of exacerbated neuroinflammation, which is mostly driven by microglial cells. The negative impact of ZIKV infection on the Central Nervous System (CNS) is widely characterized. However, the application of molecules capable of protecting against cytotoxic effects caused by this virus still is necessary. In this context, it has been extensively demonstrated that Docosahexaenoic Acid (DHA), a polyunsaturated omega 3 fatty acid, is highly neuroprotective and orchestrates essential functions for CNS homeostasis. Therefore, in the present work, we investigated the protective roles of DHA against ZIKV pathogenesis using SH-SY5Y, a neuronal-like cell, and human microglial cells. Our data showed that pretreatment with DHA prior to infection was able to improve viability and proliferation of SH-SY5Y cells, and to reduce cell death, pro-inflammatory cytokines and chemokines induced by ZIKV. DHA pretreatment was also able to restore mitochondrial function and prevent against oxidative stress that were induced by ZIKV infection. In microglial cells, DHA reduced proliferation, lipid droplet biogenesis, reactive species production and pro-inflammatory agents. In addition, DHA modulated important membrane markers associated with the regulatory function and presentation of peptide and lipid antigens by microglia. Investigating about metabolic shifts during ZIKV infection, we demonstrated that both ZIKV and DHA modulate citric acid cycle intermediates and the global metabolic profile of microglial cells. Furthermore, DHA was able to reduce viral load in both microglial and neuronal cells. Taken together, these data demonstrate that DHA has a neuroprotective, immunomodulatory and antiviral potential, being a promising molecule for therapeutic strategies against ZIKV infection.

## Lista de Tabelas e Figuras

<b>Figura 1: Principais sintomas encontrados na infecção por ZIKV .....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 2: Bioconversão de ALA em DHA, DPA e EPA .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 3: Mediadores lipídicos derivados do DHA. ....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 4: DHA protege contra o dano à viabilidade mitocondrial causado por ZIKV .....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 5: DHA aumenta a capacidade proliferativa das células neuronais.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 6: O DHA previne contra a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo causados pelo ZIKV .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 7: DHA protege contra o dano mitocondrial causados pelo ZIKV .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 8: DHA ameniza o perfil pró-inflamatório durante a infecção com ZIKV</b>	<b>49</b>
<b>Figura 9: Análise da produção de LTB4 e NO durante a infecção por ZIKV e tratamento com DHA .....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 10: ZIKV aumenta a viabilidade e proliferação da micróglia humana .....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 11: O DHA mantém a viabilidade celular e reduz a proliferação da microglia humana.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 12: Análise da biogênese de CL durante a infecção com ZIKV .....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 13: Apresentação de antígenos peptídicos durante a infecção pelo ZIKV e tratamento com DHA. ....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 14: Apresentação de antígenos lipídicos durante a infecção do ZIKV e tratamento com DHA .....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 15: Modulação de proteínas regulatórias durante a infecção do ZIKV e tratamento com DHA .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 16: A modulação de IL-6, TNF-<math>\alpha</math> e MCP-1 durante a infecção do ZIKV e tratamento com DHA .....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 17: Modulação da citocina TGF-<math>\beta</math> durante a infecção com ZIKV e tratamento com DHA. ....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 18: Avaliação da função mitocondrial da micróglia por respirometria de alta resolução .....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 19: Modulação de intermediários do Ciclo do Ácido Cítrico pela infecção do ZIKV e tratamento com DHA .....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 20: Teste ANOVA com os metabólitos obtidos pela GC-MS .....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 21: Perfil metabólico de células microgliais infectadas com ZIKV e tratadas com DHA. ....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 22: Análise de carga viral nas linhagens de neuroblastoma e microglia.....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
C6/36	Células de linhagem de <i>Aedes albopictus</i>
CFSE	Éster succinimidílico de carboxifluoresceína
CL	Corpúsculo lipídico
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DHA	Ácido Docosahexaenóico
DCF-DA	2'7'- Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
DENV	Vírus da Dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAV	Vírus da febre amarela
FCCP	Biscianocarbonil-p-trifluoro-metoxifenil-hidrazona
FRs	Fatores de replicação
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
HSV-1	Herpes simplex vírus 1
IFN- $\alpha$	Interferon- alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
MHC-II	Complexo Maior de Histocompatibilidade-II
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5 difeniltetrazólio
MSTFA	Nmetil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
<i>NF-<math>\kappa</math>b</i>	Fator nuclear kappa beta
OPLS-DA	Projeções ortogonais discriminante de estruturas latentes
OXPPOS	Fosforilação oxidativa
PUFAs	Ácidos-graxos poli-insaturados de ômega-3
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RS	Espécies Reativas
SFB	Soro fetal bovino
TCA	Ciclo tricarbóxílico
TCID <sub>50</sub>	50% da dose infectiva da cultura de tecidos
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UNS	Células não-estimuladas
ZIKV	Vírus ZIKA

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Vírus Zika

O vírus Zika (ZIKV) é um membro pertencente à família *Flaviviridae* e também classificado como arbovírus, compartilhando com outras arboviroses a característica de ser transmitido por artrópodes, tais como mosquitos do gênero *Aedes*. O vírus foi inicialmente isolado de um macaco *Rhesus* em 1947 na Floresta Zika, em Uganda, África e, anos após sua descoberta, identificado pela primeira vez em humanos em 1954, na Nigéria (1,2). Com os primeiros surtos ocorrendo no Pacífico entre 2007 e 2015 e sua dispersão para Américas, diferenças epidemiológicas da doença foram notadas pela primeira vez, trazendo a atenção da comunidade científica ao redor do mundo para essa nova epidemia (3,4). Também contribuindo para tal, o surgimento de síndromes neurológicas pós-infecção associadas ao ZIKV, até então sem precedentes comparado às outras arboviroses, gerou uma situação emergencial em saúde pública de relevância global (3). Além disso, a descoberta da transmissão materno-fetal e detecção de partículas virais ativas no trato reprodutor masculino e em secreções vaginais, caracterizando a transmissão vertical e sexual respectivamente, fomentou ainda mais a necessidade de se estudar a patogênese do ZIKV. Especialmente em relação à transmissão sexual, discute-se amplamente que esta poderia facilitar a prevalência e circulação do vírus, mesmo que não seja a principal forma de transmissão da doença (5–7). Com isso, saindo de um perfil de casos esporádicos para uma expansão geográfica em cerca de 90 países, o ZIKV implementou um esforço global para o desenvolvimento de vacinas e tratamentos, visando amenizar os efeitos danosos que a epidemia é capaz de trazer aos locais afetados pela mesma.

O ZIKV é um vírus envelopado, de RNA fita simples (ssRNA), sentido positivo, compartilhando similaridades estruturais e funcionais com outras flaviviroses, como o vírus da dengue (DENV), vírus da encefalite japonesa (JEV) e vírus da febre amarela (YFV) (8). Seu genoma contém a informação usada para

a síntese de proteínas estruturais, tais como do envelope (E), capsídeo (C) e as glicoproteínas de membrana (prM), bem como 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (8). As proteínas estruturais formam a partícula viral, enquanto as proteínas não-estruturais possuem um papel fundamental na replicação, montagem e evasão do sistema imune (9).

A entrada do vírus na célula ocorre via endocitose mediada por receptor, especialmente através dos receptores tirosina-quinase Tyro3, AXL e Mer (TAM), envolvidos na eliminação de células apoptóticas e regulação da resposta imune (8,10). Diferentes flavivírus utilizam especialmente do AXL para uma invasão silenciosa a partir da interação do vírus com o ligante natural do receptor, a proteína *growth arrest-specific 6* (Gas6), que leva à internalização da partícula pelo AXL por um mecanismo denominado mimetismo apoptótico (11). Essa interação desencadeia uma endocitose mediada por clatrina e, uma vez dentro do endossomo, o vírus utiliza da acidificação endossomal para fundir a membrana viral e celular, liberando o RNA para o citoplasma (12). O receptor AXL é expresso e foi demonstrado estar envolvido na entrada do ZIKV em diferentes tipos celulares suscetíveis à infecção, como células de Sertoli, células endoteliais, astrócito, micróglia, células progenitoras neurais, entre outras (13–15). Além do receptor AXL, o DC-SIGN (CD209), expresso na membrana de macrófagos, micróglia e células dendríticas, também é abordado como candidato para entrada do ZIKV na célula, levando em consideração a comprovada interação deste receptor com o DENV e outros flavivírus (9).

O ZIKV, assim como outras flavivírus, possui a característica de formar fatores de replicação membranosos (FRs), tais como vesículas geradas a partir de invaginações do retículo endoplasmático (RE) (12,16,17). Dentro destas vesículas, é formado um sítio seguro de replicação e montagem de vírions, pois o material genético consegue ser protegido contra RNAses e outros fatores intracelulares que reconhecem o patógeno viral. Especificamente com o ZIKV, mostrou-se que em células placentárias o vírus forma FRs a partir do RE, bem como modula a estrutura, quantidade e função de corpúsculos lipídicos (CLs) (18). Além disso, usando inibidores específicos da biogênese de CL, observou-se redução da carga viral, sugerindo um papel importante dessa organela para a

replicação viral (18). Demonstrou-se neste mesmo modelo que o perfil lipídico é remodelado durante a infecção e que este processo está relacionado à inflamação causada pelo vírus, destacando o impacto direto do metabolismo lipídico na patogênese do ZIKV (18).

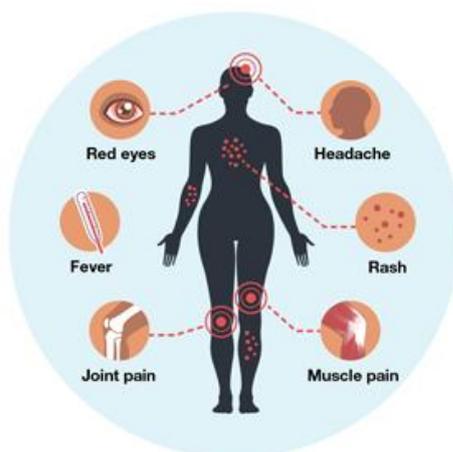
## **1.2. Características clínicas da infecção por ZIKV**

A maior parte dos casos de infecção por ZIKV são assintomáticos (50-80%) (3,19). Quando sintomáticos, os sintomas são similares aos encontrados em outras arboviroses, sendo essa uma problemática para o diagnóstico clínico entre os diferentes componentes deste grupo. A infecção por ZIKV é caracterizada por febre baixa, cefaleia, exantema, mialgia e artralgia (Figura 2) (1). Também foram relatados casos de conjuntivite e risco aumentado de perda de visão associada à inflamação ocular (20). Em idosos ou indivíduos portando algum tipo de comorbidade, a doença pode evoluir para quadros mais graves e ser fatal. Algumas das manifestações associadas aos casos mais graves são trombocitopenia, choque séptico, encefalite e outros agravos neurológicos (21,22). Os primeiros indícios de agravamento neurológico aconteceram ainda na Polinésia Francesa e, posteriormente, confirmados com a epidemia que atingiu as Américas, o que alterou todo o cenário de pesquisas acerca da infecção por ZIKV a nível global (23,24).

O ZIKV possui um grande tropismo por células neurais, tendo como consequência o desenvolvimento, pós-infecção, de síndromes congênitas em neonatos e paralisia motora em adultos (25). A paralisia motora é resultante do ataque aos nervos periféricos pelo sistema imune, caracterizando a síndrome autoimune de Guillain-Barré. Ainda não se sabe como a infecção por ZIKV é capaz de levar ao aparecimento desta síndrome, mas o que se relata, é que a hiperativação da resposta imune causada pelo vírus possa acarretar o reconhecimento de antígenos próprios e ataque às próprias células, causando o dano sistêmico (24,26,27).

Além disso, durante a epidemia das Américas, ocorreu um significativo aumento de malformações congênitas, predominantemente no sistema nervoso

central (28). Estudos iniciais detectaram o genoma do ZIKV no fluido amniótico de grávidas, demonstrando que a infecção poderia de fato ser a problemática dos danos neurológicos observados (29). O espectro de anormalidades congênitas associadas à infecção pelo ZIKV é atualmente denominado como Síndrome da Zika Congênita (SZC), englobando a microcefalia severa, desproporções craniofaciais, anormalidades auditivas e oculares, calcificações subcorticais, entre outras alterações (30). Com o avanço das pesquisas, descobriu-se que o ZIKV é capaz de infectar trofoblastos *in vitro*, os quais são importantes células constituintes da barreira placentária, levando à redução da expressão de moléculas de adesão, o que poderia provocar o aumento da permeabilidade da barreira (31). Atualmente, estudos reportam algumas hipóteses de como o vírus, após ultrapassar a barreira placentária, consegue alcançar o microambiente neural em desenvolvimento. Um dos mecanismos citados é o de transcitose, pelo qual o vírus infecta células endoteliais microvasculares presentes na barreira hematoencefálica e é transportado da região apical para a basolateral, sem comprometer a integridade das interações celulares da mesma (31,32).



**Figura 1: Principais sintomas encontrados na infecção por ZIKV.** Os sintomas são caracterizados em vermelhidão nos olhos, febre baixa, artralgia, mialgia, erupção cutânea e cefaleia. Figura adaptada de: CDC, 2019. Zika Virus: Symptoms, Testing and Treatment.

### **1.3. Impacto da infecção por ZIKV na morte, proliferação e diferenciação de células neurais**

O ZIKV é altamente neurotrópico, sendo capaz de modular diversos parâmetros do microambiente neural. Em modelos de primatas não-humanos, autópsias de fetos advindos de mães infectadas demonstraram formação incompleta, ou seja, hipoplasia, da matéria branca, acompanhada de intensa gliose e injúria axonal (33). Foi demonstrado também que o vírus infecta células progenitoras neurais, se replica eficientemente, desregula a progressão do ciclo celular, bem como induz morte por apoptose das mesmas (34,35). Além disso, observou-se que células progenitoras neurais crescendo em neuroesferas, quando infectadas pelo ZIKV, apresentam anormalidades morfológicas e padrões associados ao processo apoptótico, sugerindo um impacto negativo no processo de neurogênese durante o desenvolvimento cerebral (36). Ainda neste contexto, foi demonstrado que as proteínas NS4A e NS4B do ZIKV é capaz de inibir a via PI3K/Akt/mTor, sendo o funcionamento normal desta via essencial para a neurogênese e controle autofágico da célula (37). Ademais, foi reportado que a infecção do ZIKV causa um sequestro da proteína fosforilada TANK-binding kinase 1 (pTBK1) dos centrossomos para a mitocôndria, impedindo sua função durante o processo de mitose, ocasionando uma disfunção na proliferação de células neuroepiteliais (38).

O controle metabólico é essencial para o desenvolvimento saudável do sistema nervoso, pois o processo de migração, proliferação e diferenciação celular dependem de um metabolismo controlado (39). Algumas infecções que atingem o sistema nervoso alteram o metabolismo basal, interferindo na disponibilidade energética das células neurais (39). O ZIKV demonstrou intensa modulação de metabólitos lipídicos em células placentárias (18), e, apesar de uma caracterização em células neurais ainda ser necessária, hipóteses que correlacionam modulação de metabolismo com os agravos neurológicos já foram abordadas (39). Recentemente, um estudo demonstrou que a infecção por ZIKV é capaz de causar disfunção mitocondrial em astrócitos derivados de células-tronco, bem como aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, favorecendo estresse oxidativo celular (40). Neste sentido, é importante destacar que a modulação do

metabolismo energético tem sido fundamental para entender a patogênese do ZIKV, podendo ser um dos mecanismos chave associados ao dano no SNC causado pela infecção.

O ZIKV é capaz de causar alterações não somente através da infecção congênita. Durante os primeiros anos de vida, o sistema nervoso passa por processos de sinaptogênese e mielinização, os quais são essenciais para o desenvolvimento de aprendizado e memória (41). Estudos demonstraram que a infecção pós-natal com ZIKV é capaz de impactar negativamente o desenvolvimento neurológico, acarretando anormalidades persistentes ao comportamento e emoções, declínio cognitivo, entre outras manifestações em modelos de primatas não-humanos (42,43). O vírus também é capaz de infectar e causar danos às células-tronco neurais de camundongos adultos, levando a morte e redução da proliferação celular, demonstrando que o sistema nervoso adulto também é vulnerável à infecção por ZIKV (44). Modelos de tecidos cerebrais humanos demonstraram que o ZIKV infecta e se replica em neurônios maduros, especialmente na região do hipocampo (45). Complementar a isso, a infecção de camundongos adultos demonstrou ativação da resposta pró-inflamatória intensa no microambiente cerebral, chamado a atenção para possíveis danos cognitivos causados pelo ZIKV também em organismos adultos (45). Também foram investigados modelos de células neuronais de linhagem que são amplamente usados dentro da neurobiologia (46), como a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Estas foram reportadas como suscetíveis a infecção por ZIKV, apresentando uma redução de viabilidade em tempos tardios pós-infecção (47,48).

#### **1.4. Neuroinflamação**

O desbalanço da resposta inflamatória é um processo chave que orquestra a morte neuronal em diversas doenças neurodegenerativas (49). Estudos mostraram que neurônios infectados com ZIKV tiveram um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e fatores neurotóxicos, tais como Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e glutamato (50). A produção aumentada desses fatores está correlacionada ao processo de citotoxicidade, mostrando que a própria célula neuronal contribui para o microambiente

inflamatório e morte celular causada pela infecção (50). Contudo, as células imunológicas residentes do SNC, denominadas micróglia, são as que possuem maior impacto sob o perfil inflamatório neural. As células microgлияis são grandes sensores de alterações que ocorrem no SNC, respondendo aos estímulos através de alterações metabólicas e fenotípicas que levam a ativação celular (51). Estudos mostraram que a micróglia é suscetível ao ZIKV e, quando infectadas, levam a produção de Interleucina-6 (IL-6) e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (52). Também foi observado o aumento da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  bem como uma reação intensa denominada microgliose, pela qual há maior recrutamento e ativação microglial no sítio de infecção (45). Em contrapartida, o vírus é capaz de suprimir uma das principais respostas antivirais, inibindo a ativação da proteína TBK-1, a qual tem como uma de suas funções ativar fatores de transcrição que regulam a expressão de IFN do tipo I (IFN- $\alpha$  e  $\beta$ ) (53).

Durante o processo de ativação da micróglia, observa-se um funcionamento anormal do ciclo de ácido cítrico e uma atividade aumentada das vias de síntese de ácidos-graxos *de novo* (51). Este processo culmina na maior biogênese de Corpúsculos Lipídicos (CL), sendo estes importantes organelas associadas ao armazenamento lipídico, biossíntese de mediadores inflamatórios e sinalização celular (51,54). Foi reportado que tanto a distribuição quanto a composição dos CL são capazes de influenciar nos diferentes perfis de ativação microglial, demonstrando a importância do controle do metabolismo lipídico para a função desta célula imunológica (51).

A micróglia é fundamental para a modulação de uma resposta imune robusta no SNC. Além de ser linha de frente da resposta imune inata, as células microgлияis agem também como apresentadoras de antígenos (APC), tendo um papel fundamental na manutenção de uma resposta imune adaptativa proveniente de linfócitos T infiltrantes no SNC (55). Assim como outras APCs, as células microgлияis possuem a capacidade de apresentar antígenos peptídicos gerados em compartimentos de vias endocíticas para células TCD4+ específicas (55,56). Esse tipo de apresentação antigênica é proporcionado pela presença de moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe II (MHC-II), constitutivamente expressas na membrana de APCs. Apesar da expressão de MHC-II ser baixa em células microgлияis em estado de repouso, a indução da expressão desta molécula

é uma característica comumente encontrada quando a micróglia está ativada, sendo este perfil aumentado de micróglia MHC-II+ observado em diferentes doenças neurodegenerativas (57). A ativação do linfócito TCD4+ pela micróglia (e por APCs em geral) requer tanto a exposição do complexo MHC-antígeno, como a expressão de moléculas co-estimulatórias da família B7 na superfície da célula (58). Estas moléculas, tais como CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2), são responsáveis em gerar um segundo sinal que impede o estabelecimento do estado de anergia da célula T, promovendo a ativação linfocitária (55,57). Além disso, outras proteínas de membrana são capazes de influenciar no tipo de resposta que será induzida pela micróglia. Foi reportado que essa célula pode expressar, em determinadas condições, o ligante de morte programada 1 (PD-L1), sendo este um importante ligante com ação inibitória da resposta de células T (55,59). Além disso, também foi demonstrado que a micróglia expressa a proteína DC-SIGN (CD209), considerada marcadora de polarização alternativa de macrófagos (M2) e associada a um perfil supressor da resposta imune em células microgliais (60,61).

Indícios demonstram uma forte modulação do metabolismo associada a infecção por ZIKV e essa alteração direciona novos caminhos a serem explorados quanto à sua patogênese (18,39). Dentro da resposta imune, estuda-se uma família de glicoproteínas de membrana denominadas cluster de diferenciação 1 (CD1), as quais podem ser expressas constitutivamente (CD1d) ou serem induzidas (CD1a, CD1b e CD1c) em células apresentadoras de antígeno (APC), tais como células dendríticas, macrófagos e micróglia (62). A família CD1 tem a capacidade de se ligar e apresentar antígenos lipídicos à um conjunto de células T restritas a esse tipo de reconhecimento antigênico. Estas são denominadas células natural killers T, que podem ser do tipo 1 (iNKT) ou tipo 2 (NKT), e, recentemente, demonstrou-se que as células T  $\gamma\delta$  possuem a capacidade de reconhecer antígenos lipídicos apresentados via CD1c (63,64). Infecções virais podem alterar o perfil metabólico da célula, alterando o espectro de lipídeos que normalmente são apresentados pela família CD1, induzindo uma resposta antiviral que pode ser essencial para combater o patógeno (65). Ainda não se tem dados explorando o potencial do ZIKV em modular apresentação de antígenos lipídicos e peptídicos pela micróglia e qual o impacto disso na resposta do hospedeiro. Contudo, analisando o potencial

modulador do metabolismo associados a infecção por este vírus, é possível que esse tipo de apresentação antigênica tenha um papel importante na patogênese do ZIKV.

Considerando o efeito citopático e inflamatório comprovado em neurônios e outros modelos semelhantes às células neuronais, como neuroblastoma, verifica-se que é altamente pertinente estudos com moléculas capazes de exercer um efeito neuroprotetor e anti-inflamatório contra a infecção por ZIKV. Neste contexto, existe uma classe biomoléculas lipídicas de ômega-3 que tem sido amplamente estudada pelo seu potencial de manutenção da homeostase metabólica, e especialmente acerca do seu proeminente efeito neuromodulador, desencadeando uma série de pesquisas aplicando tais moléculas contra doenças neurodegenerativas.

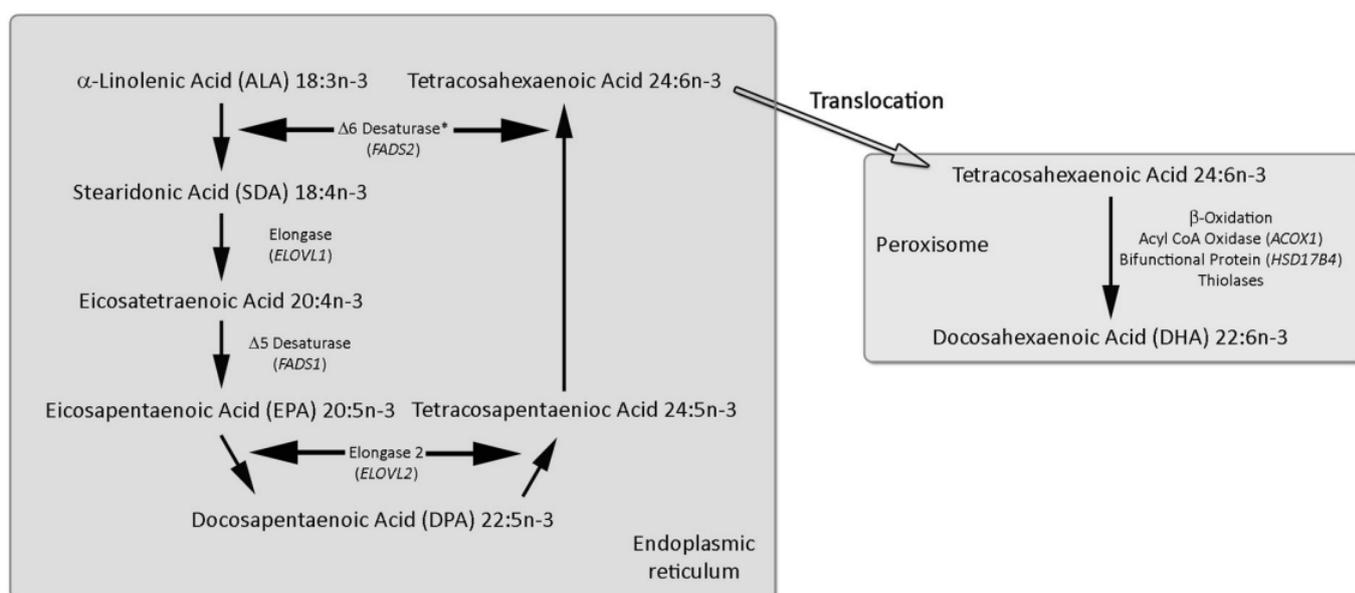
### **1.5. Os ácidos graxos poli-insaturados de ômega-3**

Os ácidos graxos de poli-insaturados de ômega-3, comumente chamados de  $\omega$ -PUFAs, são ácidos graxos que possuem mais de uma ligação dupla, sendo a primeira delas localizada entre o terceiro e o quarto carbono a partir do grupo metil ao final da cadeia carbônica do lipídio (66). São ácidos graxos essenciais que não podem ser sintetizados a partir da via *de novo* da célula, logo devem ser adquiridos pela dieta. As principais formas de obtenção de  $\omega$ -PUFAs se dá pela ingestão de peixe de águas frias e outros organismos marinhos, ou pela suplementação com óleo de peixe (67). Outros alimentos comuns à dieta, tais como chia, linhaça, óleo de soja e de canola apresentam em sua composição um precursor importante para a síntese de  $\omega$ -PUFAs no organismo (68), contudo, essa produção é demasiadamente limitada.

Atualmente, os PUFAs de ômega-3 que mais possuem efeitos biológicos descritos são os ácidos  $\alpha$ -linolênico (ALA), docosapentaenoico (DPA), docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA) (69). O metabolismo do ALA é capaz de levar à síntese endógena de diferentes  $\omega$ -PUFAs, como o EPA e DHA, por uma série de reações de oxidação e alongação (Figura 2). Contudo, a concentração desses lipídeos proveniente desse processo é considerada baixa em

humanos, além de fatores como idade e alterações metabólicas reduzirem ainda mais a produção endógena (70). Com isso, sugere-se a implementação diária desses lipídeos na dieta para obtenção de maiores concentrações para que os mesmos possam executar suas diferentes funções benéficas no organismo.

Estudos recentes demonstraram que os  $\omega$ -PUFAs possuem relevância clínica devido ao seu potencial antitumoral comprovado *in vivo* e *in vitro* em diferentes tumores (71–73), bem como mecanismos protetores contra doenças cardiovasculares e síndromes metabólicas (74–76). Contudo, uma das propriedades mais exploradas destes ácidos-graxos, é a sua proeminente atividade neuroprotetora. Atualmente, estudos reportam que o DHA é o PUFA mais importante para o microambiente neuronal, sendo o cérebro o órgão que possui as maiores taxas deste lipídio em sua composição (77).



**Figura 2: Bioconversão de ALA em DHA, DPA e EPA.** Através da ação enzimática progressiva, os  $\omega$ -PUFAs de cadeia longa são sintetizados a partir do metabolismo do ALA, sendo o início da cascata de reações no retículo endoplasmático formando EPA e DPA, seguido da translocação do intermediário ácido tetracosahexaenóico para o peroxissomo, onde o DHA é formado por um ciclo da via de  $\beta$ -oxidação. Adaptado de: Dyall, Simon C. 2015. Long-chain  $\omega$ -3 fatty acids and the brain: a review of independent and shared effects of EPA, DPA and DHA.

## 1.6. Efeito neuroprotetor e anti-inflamatório do DHA

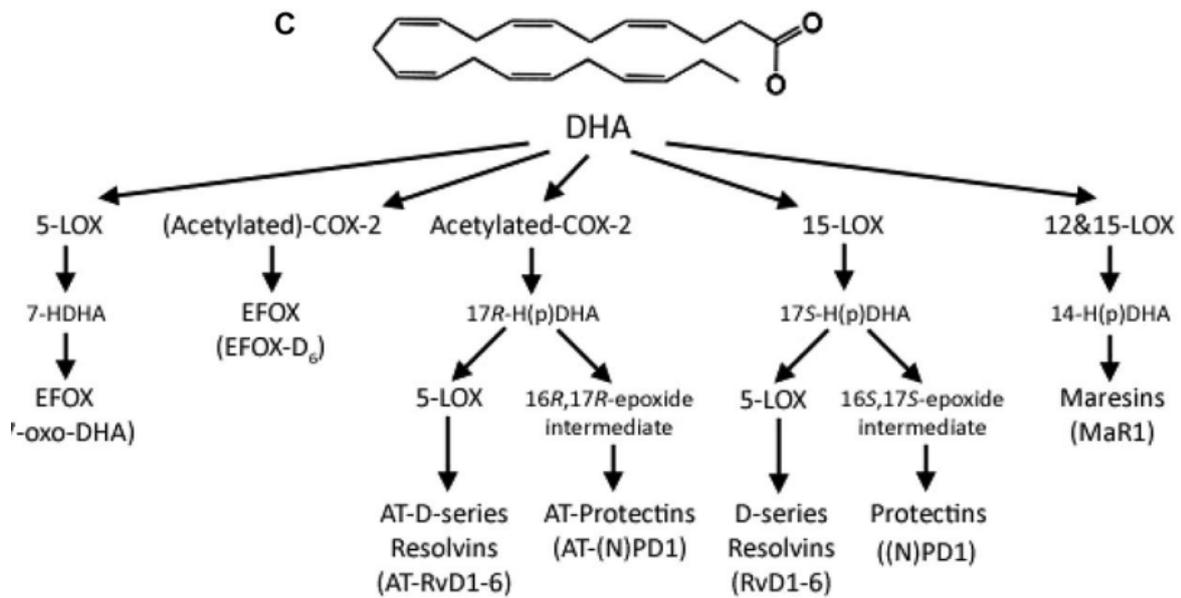
O DHA apresenta um papel fundamental para o processo de maturação e desenvolvimento neuronal (78,79). Estudos mostraram que o tratamento com DHA foi capaz de estimular o crescimento de neuritos, expressão de proteínas sinápticas, entre outras modulações positivas para o desenvolvimento neuronal (80). Além disso, trabalhos demonstraram que o DHA é capaz de ter ação protetora contra injúrias cerebrais e declínios cognitivos, através do estímulo de vias clássicas de sobrevivência celular (78,81), tais como PI3K/AKT/mTOR (82,83) e aumento da expressão das proteínas Bcl-2 e Bcl-xL (84). Foi demonstrado também que o DHA leva à inibição de proteínas pró-apoptóticas, como Bax, Bad e caspase-3 (75,84), bem como mantém a integridade da membrana em quadros de lesões isquêmicas hipóxicas e em agregações de  $\beta$ -amiloide, protegendo contra a morte celular lítica e apoptótica massiva observada nestas condições (85,86).

O DHA é também um importante constituinte de membranas biológicas, especialmente no SNC, onde observa-se uma alta retenção deste lipídio na membrana celular de neurônios e células gliais (87,88). Também foi reportado um acúmulo considerável deste lipídio no cérebro em formação durante o desenvolvimento fetal, aumentando progressivamente até os dois primeiros anos de vida (68,88–90). A composição lipídica da membrana influencia substancialmente nas propriedades físicas da mesma. Interações de proteínas que residem na membrana com os lipídeos que a compõe, criam diferentes agregações ordenadas que se diferem da membrana circundante, comumente chamadas de domínios ou, pelo termo recém abordado na literatura, *raft* lipídico (91,92). O conjunto dos diferentes *rafts* lipídicos conferem a capacidade de assumir alterações na responsividade e propagação de sinais a depender da composição lipídica diversa da membrana celular (91). Neste contexto, reportou-se que o armazenamento do DHA na forma de diferentes fosfolipídios na membrana neuronal altera a composição da mesma, e, conseqüentemente, modifica também o *raft* lipídico, impactando na integridade e excitabilidade da membrana celular, bem como transmissão de sinais entre células (70,93). Essa retenção de DHA atua como um reservatório, podendo ser liberado pela ação de fosfolipases a depender da demanda intracelular e servindo como ativador de fatores transcricionais, ou como importante precursor da biossíntese de mediadores lipídicos (70). Ademais, a incorporação de

DHA na membrana celular reduz a concentração de ácido araquidônico na mesma, sendo este o precursor da biossíntese eicosanoides, os quais são potentes mediadores lipídicos pró-inflamatórios (94).

Um dos mecanismos mais explorados das ações benéficas do DHA no microambiente neuronal é através da biossíntese de potentes mediadores lipídicos, denominados docosanóides, os quais são capazes de alterar o perfil de expressão gênica e levar a uma alteração na resposta inflamatória da célula (75,95). Neste processo, o DHA age como precursor da ação enzimática de cicloxigenases, lipoxigenases e da família do citocromo P450, que a depender de diferentes condições, podem sintetizar mediadores anti-inflamatórios, tais como maresinas, resolvinas e protectinas (68,75). Além disso, um dos mediadores com um dos maiores impactos na sobrevivência neuronal, a neuroprotectina D1 (NPD1), também é produzida por este mecanismo (96). A NPD1 é reportada como um agente protetor sintetizado em quadros de injúria neuronal (96,97), sendo capaz de proteger contra infiltração leucocitária no SNC, bem como age inibindo a produção de citocinas desencadeada pela via da enzima cicloxigenase-1 (COX-1) (96,98).

Apesar dos diversos efeitos benéficos descritos acerca da suplementação com DHA, ainda é pouco explorado o seu potencial de proteger contra danos neuronais causados por infecções virais que atingem o SNC.



**Figura 3: Mediadores lipídicos derivados do DHA.** A partir da ação de cicloxigenases e lipoxigenases, o DHA pode ser convertido em diferentes mediadores lipídicos que possuem papel fundamental no controle da resposta imune. Entre estes mediadores que podem ser produzidos, destacam-se as maresinas, resolvinas e as neuroprotectinas. Adaptado de: Dyall, S., 2015. Long-chain omega-3 fatty acids in the brain: a review of independent and shared effects of EPA, DPA and DHA.

## 2. Justificativa

O ZIKV apresenta um elevado tropismo por células neurais, modulando negativamente diversas vias associadas a proliferação, sobrevivência e progressão do ciclo celular. A quebra da homeostase neuronal causada pela infecção conduz a uma neuroinflamação intensa, sendo a micróglia um importante contribuinte deste processo inflamatório. A modulação de vias morte, bem como a inflamação prolongada induzida pela infecção auxiliam na manutenção de um microambiente desfavorável à sobrevivência neuronal. Com isso, é evidente a necessidade de pesquisas que visam identificar moléculas com potencial protetor contra os efeitos citotóxicos causados pelo ZIKV. Nos últimos anos, o PUFA de ômega-3 DHA vem sendo aplicado em diversos modelos de doenças neurodegenerativas. Foi reportado que o DHA é capaz de ativar vias de sobrevivência, de inibir vias de morte celular e de modular o microambiente neural para um perfil anti-inflamatório, reduzindo o comprometimento tecidual em doenças que afetam o SNC. Após a descrição da patogênese do ZIKV e abordagem dos efeitos deletérios que o mesmo causa em células neurais, investigar a aplicação do DHA contra esta infecção é altamente promissor, uma vez que ambos agem em vias similares, de formas opostas. Ainda não se sabe se o DHA possui algum impacto sobre a morte celular, proliferação, disfunção mitocondrial e neuroinflamação causadas na infecção pelo ZIKV. Além disso, indícios apontam que o ZIKV induz uma intensa modulação do metabolismo celular, sendo esta crucial para a sua patogênese e replicação. É necessário melhor elucidar este processo em células microgliais, pois as mesmas podem ter um perfil de ativação diferencial através da alteração metabólica. Ademais, é relevante identificar se o DHA, que também modula o metabolismo celular, poderia impactar na patogênese do ZIKV, o que poderia refletir em consequências na própria replicação viral.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar o potencial efeito neuroprotetor, imunomodulador e anti-viral do ômega-3 (DHA) na infecção neuronal e microglial pelo ZIKV.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- a) Avaliar o impacto da infecção pelo ZIKV, na presença e ausência do pré-tratamento com DHA, sobre a viabilidade, morte e proliferação da linhagem neuronal humana.
- b) Investigar o efeito da infecção do ZIKV, na presença e ausência do pré-tratamento com DHA, na função mitocondrial na linhagem neuronal humana.
- c) Caracterizar o perfil inflamatório da linhagem da neuronal humana durante a infecção com ZIKV, na presença e ausência do DHA.
- d) Avaliar as modulações na viabilidade e proliferação causadas pelo ZIKV sobre as células microgliais, na presença e ausência do DHA.
- e) Caracterizar o perfil de ativação celular e apresentação antigênica das células microgliais durante a infecção pelo ZIKV, na presença e ausência do DHA.
- f) Caracterizar o perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por células microgliais durante a infecção pelo ZIKV, na presença e ausência do DHA.
- g) Avaliar a função mitocondrial e estresse oxidativo celular durante a infecção pelo ZIKV, na presença e ausência do DHA.
- h) Avaliar o impacto da infecção pelo ZIKV, na presença e ausência do DHA, no perfil metabólico das células microgliais.
- i) Avaliar o impacto do pré-tratamento com DHA na carga viral das linhagens de neuronal humana e micróglia humana.

## 4. Metodologia

### 4.1. Preparo das células, pré-tratamento e infecções

#### 4.1.1. Cultivo Celular

SH-SY5Y: Célula de neuroblastoma humano (ATCC SH-SY5Y), usada como modelo semelhante à célula neuronal, cultivada em meio DMEM/F12 (1:1), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100µM de penicilina/estreptomicina, adquiridos pela Sigma Aldrich. As células foram mantidas em uma estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

C20: Linhagem microglial humana obtida por David Alvarez-Carbonell (Case Western Reserve University) (99), o qual realizou um processo de isolamento da micróglia primária de tecido cerebral humano, seguido de imortalização com uso do antígeno T do vírus símio 40 (SV40 T) e da indução da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT). O clone representativo C20 foi caracterizado a nível de expressão gênica, marcadores de superfície e perfil de citocinas secretadas (99). A linhagem foi cedida gentilmente pelo Professor Hugo Paes, cultivada em DMEM/F12 (1:1), suplementada com 10% de SFB e 100µM de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich). As células foram mantidas em uma estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Vero: Linhagem de células derivadas de tecido epitelial do rim de macaco (*Cercopihecus aethiops*), comumente usada para expansão viral. Foi cultivada em DMEM/F12 (1:1), suplementada com 10% de SFB e 100µM de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich). As células foram mantidas em uma estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

BHK-21: Células derivadas de fibroblasto do rim de hamster (*Mesocricetus auratus*), comumente usada para titulação viral. Foram cultivadas em DMEM/F12 (1:1), suplementadas com 10% de SFB e 100µM de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich). As células foram mantidas em uma estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

C6/36: Células da larva do mosquito (*Aedes albocinctus*). Foram cultivadas em meio TC100 suplementado com 10% de SFB e encubadas em uma estufa à 37°C na ausência de CO<sub>2</sub>.

#### **4.1.2. Expansão viral**

A cepa viral do ZIKV brasileira foi denominada ZIKV BR (ZIKV/Homo sapiens/PE243/2015, GenBank: KX197192.1) utilizado nesse trabalho foi isolada no Brasil, do soro de um paciente em fase aguda no estado do Pernambuco durante o período do surto em que ocorreu na região em 2015. Inicialmente o vírus foi propagado uma vez em células C6/36 e mais duas vezes em células Vero.

Para a propagação viral, a confluência das células a serem infectadas estava em cerca de 70% e, um dia anterior à infecção, a concentração de SFB no meio de cultura foi reduzida para 2%. Uma alíquota do vírus foi utilizada para infectar as células e após cinco dias observou-se um efeito citopático da infecção. Com isso, o meio de cultura foi coletado e centrifugado a 4°C, a 300g (1800 rpm) durante 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado com auxílio de filtros de 0,22 µm e posteriormente congelado à -80°C gerando o estoque viral, o qual foi quantificado posteriormente.

#### **4.1.3. Titulação Viral**

Para titulação viral através da análise das unidades formadoras de placas (PFU), foram utilizadas as células BHK-21. Estas foram plaqueadas em placas de 24 poços, na densidade de 10<sup>5</sup> células, em meio de cultura suplementado com 2% SFB. Para realizar a infecção das placas, foram feitas 7 diluições do ZIKV em meio de cultura. Após o período de 2h de infecção, o sobrenadante foi descartado e o meio semissólido (DMEM + SFB 2% + 2,9% Carboximetilcelulose (CMC)) foi adicionado aos poços. A placa foi incubada a 37°C durante o período de 6 dias e em seguida o meio semissólido foi retirado e o fixador formalina 3.7% foi adicionado, mantido overnight a 4°C. Após fixação, foi adicionado o corante Cristal violeta pelo período de 3h para fazer a coloração das células, e, em seguida, a placa foi encaminhada para a etapa de lavagem em água destilada. A placa foi cuidadosamente secada para devida visualização e contagem dos *spots*. Para o cálculo da titulação viral é feita a contagem dos *spots* resultantes dos poços em

triplicata, seguida da média aritmética entre eles. Após a média ser feita, esta é inserida na fórmula:  $P \times F \times D = (\text{PFU/ml})$ , sendo P a média do número de placas, F o fator de correção para expressar o título de PFU/ml ( $1000\mu\text{l}/\text{volume do inoculo}$ ) e D o fator de diluição que as unidades de placas foram formadas. O título obtido foi equivalente à  $10^{10}$  PFU/ml, o que foi posteriormente confirmado por PCR quantitativa em tempo real (RTq-PCR).

#### 4.1.4. Tratamentos e infecções

Para os experimentos, foram usadas as seguintes condições:

UNS: Células não-tratadas e não-infectadas.

DHA: Células não-infectadas, tratadas com DHA.

ZIKV: Células infectadas com ZIKV, não-tratadas com DHA.

ZIKV+DHA: Células infectadas com ZIKV, tratadas com DHA.

As células SH-SY5Y e C20 foram pré-tratadas (ou não) com o DHA (Sigma-Aldrich), na concentração de  $12,5\mu\text{M}$ . O DHA está na concentração estoque de  $20\text{mM}$ , tendo como veículo etanol puro. A diluição foi feita em vidros próprios para manipulação de lipídios e, uma vez tendo adicionado o volume requerido de DHA, foi deixado todo o etanol passar pelo processo de evaporação antes de se adicionar o meio para completar a diluição. Uma vez evaporado, adicionou-se o volume necessário de meio e o recipiente foi encaminhado para 10 minutos na sonicatora, em temperatura ambiente, para abertura das cadeias de ácido-graxo e melhor incorporação do lipídio à célula. Após sonicação, o estímulo foi feito de imediato e as células foram mantidas por 1h na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o período de incubação, as células foram lavadas delicadamente com tampão fosfato-salino (PBS) e, posteriormente, infectadas (ou não) com ZIKV PE<sub>243</sub> MOI 10, diluído em meio DMEM/F12 com 2% de SFB. Células não-tratadas com DHA que são do grupo ZIKV também foram lavadas com PBS e infectadas, utilizando as mesmas condições. Foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  e, após este período, adicionou-se meio novo às células, as quais permaneceram na estufa por 24, 48, 72 ou 96h, a depender da análise necessária. As células da condição UNS foram lavadas com PBS, tiveram o meio novo adicionado e foram mantidas

incubando junto às outras condições.

## **4.2. Análises de viabilidade e morte celular**

### **4.2.1. Ensaio de viabilidade mitocondrial por MTT**

As células SH-SY5Y e C20 foram plaqueadas em placas de 96 poços (n=5), com densidade celular de  $5 \cdot 10^4$  células por poço. Após 24, 48, 72 e 96h de infecção e tratamento, a viabilidade celular dependente da atividade mitocondrial foi avaliada pelo uso do MTT (Thermo Fisher 5mg/ml), usado em uma solução de 10% de MTT em meio DMEM/F12 sem SFB. As células com MTT 10% foram incubadas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 1h. A detecção da coloração roxa proveniente dos cristais de formazan, formados pela redução do MTT por desidrogenases mitocondriais, foi feita por espectrofotometria à 570nm, utilizando o equipamento SpectraMax M2 (Molecular Devices).

### **4.2.2. Viabilidade Celular por Cristal Violeta**

As células C20 foram plaqueadas em placas de 96 poços (n=5), com densidade celular de  $5 \cdot 10^4$  células por poço. Após 96h de infecção e tratamento, a viabilidade celular foi mensurada de forma indireta usando o protocolo de marcação com Cristal Violeta já descrito na literatura (100). Células aderentes se soltam da placa quando entram em processo de morte celular, já o cristal violeta tem a capacidade de ligar e marcar células que ficaram aderidas no poço. Logo é possível inferir a respeito de viabilidade e proliferação de forma indireta, pois quanto maior a marcação para este reagente, maior a densidade celular desta condição. Sabendo disso, as células foram lavadas com PBS, fixadas com PFA 4% por 30 minutos e, posteriormente, marcadas com a solução de cristal violeta (0,2%) por 10min. Após a marcação, a placa foi lavada com água destilada e adicionou-se SDS (1%) para fazer eluição do reagente. As amostras foram lidas usando o SpectraMax M3 (Molecular Devices) à 570nm. A variação dos valores de absorbância foi usada para associar às modulações na viabilidade celular.

### **4.2.3. Análise de Morte celular por Anexina-PI**

As células SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 24 poços (n=3), com densidade celular de  $1.10^5$  células por poço. Após 96h de infecção e tratamento, a morte celular lítica e apoptótica foi avaliada pela marcação com as sondas Anexina-V FITC (BD Biosciences) e Iodeto de Propídio (PI-Sigma-Aldrich), sendo este último usado na concentração de 50 $\mu$ g/ml. As células foram desaderidas da placa com uso de tripsina e transferidas para tubos Eppendorf, onde as mesmas foram marcadas com 50 $\mu$ l das sondas diluídas em Binding Buffer por 15min, à temperatura ambiente. Após a marcação, as amostras foram lavadas 1x com PBS, ressuspendidas em Binding Buffer e analisadas por citometria de fluxo, utilizando o equipamento BD FACS-Verse e o software FlowJo.

## **4.3. Análise de Proliferação e Ciclo celular**

### **4.3.1. Análise de proliferação celular por CFSE**

As células SH-SY5Y e C20 foram plaqueadas em placas de 24 poços (n=3), com densidade celular de  $1.10^5$  células por poço. Anteriormente aos estímulos, as células foram marcadas com o CFSE (Thermo Fisher), na concentração de 5 $\mu$ M em meio sem SFB e incubadas por 15min à temperatura ambiente. Após incubação, foi feita a etapa de bloqueio por 5min com SFB puro, seguida de uma lavagem com PBS e dos respectivos estímulos/infecções. A sonda CFSE interage com aminas biogênicas e uma vez que a célula que o incorporou passe pelo processo de divisão celular, as células filhas apresentam metade da fluorescência da célula original; logo, quanto maior a proliferação, menor a fluorescência da condição analisada. Após 96h de interação, as células foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando os equipamentos BD FACS-Verse e FACS-Calibur, e posteriormente o software FlowJo.

### **4.3.2. Análise de Ciclo Celular por PI**

As células SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 24 poços (n=5), com densidade celular de  $1.10^5$  células por poço. Após 72h de tratamento e infecção,

as células foram desaderidas e fixadas usando etanol 70% (v/v) por duas horas. Em seguida, as mesmas foram suspensas em 50µl de solução de PI, composta de: 0.1% de citrato de sódio, 0.1% Triton-X (v/v), 20µg/ml de PI, 50µg/ml de RNase, diluídos em PBS. Após incubação de 30min à temperatura ambiente, adicionou-se PBS às amostras e estas foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando o equipamento BD FACS-Verse e o software FlowJo.

#### **4.4. Análise da função mitocondrial e estresse oxidativo**

##### **4.4.1. Análise de espécies reativas intracelulares**

As células SH-SY5Y e C20 foram plaqueadas em placas de 24 poços (n=3), com densidade celular de  $1.10^5$  células por poço. Após 96h de infecção e tratamento, as células foram desaderidas e marcadas por 30min com a sonda DCF-DA (Sigma-Aldrich), na concentração de 20µM. Após a marcação, as células foram lavadas 3x com PBS, fixadas com PFA 1% logo e, em seguida, analisadas por citometria de fluxo, utilizando os equipamentos BD FACS-Verse e FACS-Calibur, e, posteriormente, o software FlowJo.

##### **4.4.2. Respirometria de alta resolução**

As células SH-SY5Y e C20 foram plaqueadas em placas de 6 poços (n=5), com densidade celular de  $1.10^6$  células por poço. Após 48h de infecção e tratamentos, as células foram suspensas em um total de 2ml de meio sem SFB e a taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi avaliada usando um respirômetro de alta resolução (OROBOROS Oxygraph-2k), a 37°C, em agitação contínua à 750rpm. Ao início de cada dia de experimento rodado, o equipamento foi calibrado com o meio usado para fazer o cultivo das linhagens, DMEM/F12 sem SFB. Diferentes inibidores foram adicionados e o consumo de oxigênio analisado após estabilização do sinal frente a estes estímulos. Os inibidores usados foram: inibidor da ATP sintase Oligomicina 1.25µM, pelo qual foi possível a obtenção do dado de consumo de oxigênio acoplado à síntese de ATP; o desacoplador da cadeia transportadora de elétrons FCCP, adicionado em pulsos de 100nM, o qual

permite analisar a capacidade respiratória máxima da célula; inibidor do complexo III da CTE Antimicina A  $2.5\mu\text{M}$ , pelo qual foi possível analisar o consumo de oxigênio residual (ROX).

#### **4.4.3. Detecção de mitocôndrias por microscopia fluorescente**

As células SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $n=3$ ) contendo lamínula para microscopia, em uma densidade celular de  $1.10^5$  células por poço. Após 72h de infecção e tratamento, as mitocôndrias das células viáveis foram marcadas, por 45 minutos à  $37^\circ\text{C}$ , com a sonda MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher), na concentração de  $100\text{nM}$ , diluída em meio sem SFB. Após a marcação, as células foram lavadas 3x com PBS e fixadas com formalina 3.7% por 15 minutos. Posteriormente, as células tiveram seu núcleo marcado com a sonda DAPI, diluída em PBS (1:1000), incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e lavadas com PBS após a marcação. As amostras foram analisadas pelo microscópio de fluorescência EVOS Cell Imaging System (Thermo Fisher) e a quantificação da intensidade de fluorescência feita através do software ImageJ.

### **4.5. Análise do Perfil Inflamatório**

#### **4.5.1. Dosagem de Citocinas por ELISA**

O sobrenadante proveniente das células SH-SY5Y e C20 foi coletado em diferentes tempos pós-infecção e tratamento e armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do experimento. A secreção das citocinas IL-6, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e da quimiocina MCP-1 foi quantificada pela técnica de ELISA, usando kits comerciais da BD Biosciences e seguindo as especificações dos protocolos elaborados pelo fabricante. Os valores de absorbância foram gerados através da leitura no espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices), em um comprimento de onda de  $450\text{nM}$ . A concentração das citocinas foi calculada com base na curva padrão feita para cada uma delas, demonstradas em valores absolutos em  $\text{pg/ml}$ .

#### **4.5.2. Dosagem de Eicosanoides**

O sobrenadante proveniente das células SH-SY5Y e C20 foi coletado em diferentes tempos pós-infecção e tratamento e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do experimento. Estes foram usados para a detecção dos eicosanoides  $\text{LTB}_4$  e  $\text{PGE}_2$ , ambos da Cayman Chemical ELISA Kit, seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. A concentração destes lipídios é calculada com base em um ensaio competitivo, onde a absorvância detectada pelo espectrofotômetro é inversamente proporcional a concentração de  $\text{LTB}_4$  ou  $\text{PGE}_2$  presente na amostra. As placas foram lidas no SpectraMax M3 (Molecular Devices), a  $412\text{nm}$ , e as concentrações, baseadas na curva padrão, expressas em  $\text{pg/ml}$ .

#### **4.5.3. Quantificação de Óxido Nítrico (NO)**

O sobrenadante proveniente das células SH-SY5Y foi coletado em diferentes tempos de infecção e tratamento e armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do experimento. Estes foram usados para a quantificação de NO através do Reagente de Griess (Sigma-Aldrich), o qual permite estimar a concentração de um importante produto da quebra NO, o nitrito. O protocolo seguido foi disponibilizado pelo fabricante. Após adição das amostras e do reagente, incubou-se por 10min à temperatura ambiente. Foi feita a leitura a  $540\text{nm}$  utilizando o SpectraMax M3 (Molecular Devices). As concentrações foram estimadas a partir da curva padrão de Nitrito de Sódio ( $\text{NaNO}_3$ ), representada em  $\mu\text{M}$ .

#### **4.5.4. Biogênese de corpúsculos lipídicos por citometria e espectrofotometria**

As células C20 foram plaqueadas em placas de 24 poços ( $n=3$ ) para análise de citometria ou plaqueadas em 96 poços ( $n=5$ ) para a análise de espectrofotometria, com densidade celular de  $1.10^5$  e  $5.10^4$  células respectivamente. Após 96h de infecção e tratamento, a biogênese de CL foi analisada por citometria de fluxo através da aplicação da sonda lipofílica fluorescente Bodipy 493/503 (Life Technologies), a qual se liga à lipídios neutros presentes em CLs. O Bodipy foi diluído em PBS (1:1000) e as células foram marcadas com essa solução a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 30min. Após incubação, as células foram lavadas com PBS e em seguida analisadas por citometria de fluxo,

utilizando o equipamento FACS-Calibur e o software FlowJo. Também foi realizado o ensaio quantitativo por espectrofotometria, utilizando um corante lipofílico denominado *Oil Red O* que também apresenta afinidade por lipídios neutros armazenados no CL. As células foram fixadas ainda na placa com PFA 4% e em seguida marcadas com a solução de trabalho (diluição de 2:3 de Oil Red O, o qual deve estar previamente diluído em isopropanol, em água destilada). Após 50min incubando à temperatura ambiente, as amostras foram lavadas com água destilada, seguida da eluição com isopropanol 100% e leitura a 520nm no SpectraMax M3 (Molecular Devices).

#### **4.5.5. Análise da ativação microglial por citometria de fluxo**

As células C20 foram plaqueadas em placas de 24 poços, em uma densidade celular de  $1.10^5$  células por poço. Após 24h de infecção e tratamento, foram avaliados, pelo uso de anticorpos humanos, parâmetros relacionados à ativação microglial, tal como apresentação de antígenos com anti-MHC-II (Abcam); expressão de moléculas co-estimulatórias com anti-CD80 (eBiosciences); expressão do ligante de morte programada-1 com anti-PD-L1/CD274 (BD Biosciences); expressão de marcadores microgliais anti-inflamatórios com anti-DC-SIGN/CD209 (eBiosciences); apresentação de antígenos lipídicos com anti-CD1a, anti-CD1b e anti-CD1c (Biolegend). Os anticorpos foram diluídos em PBS em uma concentração de 1:30 e incubados por 30min a 4°C. Após incubação, as células foram lavadas 2x com PBS, suspensas em PBS com 2% de SFB e em seguida por citometria de fluxo, utilizando o equipamento FACS-Calibur e o software FlowJo. Para cada uma das análises, um controle de isotipo dos respectivos anticorpos conjugados foi disponibilizado para configuração correta do citômetro.

### **4.6. Análise do Perfil Metabólico**

#### **4.6.1. Extração dos metabólitos e preparo das amostras**

As células C20 foram plaqueadas em placas de 6 poços, em uma densidade celular de  $5.10^6$  células por poço. Para a extração dos metabólitos, as células foram desaderidas após 48h de infecção e tratamento e transferidas para tubos eppendorf, nos quais foram adicionados 1000µl de metanol (Sigma-Aldrich) puro e 60µl de

ribitol (0.1mg/ml). Em seguida, as amostras foram incubadas a 4°C overnight e, após incubação, foram sonicadas à temperatura ambiente por 15 minutos, seguida de uma centrifugação à 10000g por 15min. Após este processo, a fração aquosa superior contendo os metabólitos foi transferida para um novo tubo, separando-se do lisado celular contaminante, e direcionada para a próxima etapa experimental. Estas alíquotas foram secadas a vácuo e passaram pelo processo de derivatização, o qual foi realizado com uso de 40µl de cloridrato de metoxiamina 20mg/ml (Sigma-Aldrich) em piridina (Merck) e incubado por 2h, a temperatura ambiente e agitação constante. Após incubação, foi adicionado MSTFA às amostras, as quais foram incubadas por 30 minutos a 37°C.

#### **4.6.2. Perfil metabólico por GC/MS**

Com a derivatização completa, 100µl das amostras foram transferidos para inserções de vidro de microvolume para cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), a qual foi realizada através do CG-MS quadruplo Agilent 7890-5975, equipado com uma coluna HP5-MS 30m (Agilent). As amostras foram injetadas em pulsos (10:1) a 230°C, em fluxo contínuo de 0.6ml min<sup>-1</sup>, usando o hélio como gás carreador. Os cromatogramas obtidos foram direcionados para análise preliminar de varredura completa (70 m/z a 600 m/z) e usadas para estabelecer um método SIM (monitoramento seletivo de íons), que foram então usados para detecção de ácidos orgânicos. Em relação a estes últimos, os íons-alvo foram malato 233, fumarato 245, succinato 247, citrato 273 e o padrão interno ribitol 319. Para análise dos demais metabólitos, foi feito um alinhamento através do software MetAlign, com posterior análise utilizando a plataforma MetaboAnalyst. Os picos de identificação foram realizados usando o software NIST MSSEARCH e a biblioteca espectral de NIST. A intensidade dos picos foi corrigida em relação às variações do padrão interno ribitol usado no experimento.

### **4.7. Análise de carga viral**

#### **4.7.1. Extração de RNA**

As células SH-SY5Y e C20 foram plaqueadas em placas de 24 poços, em uma densidade celular de 1.10<sup>5</sup> células por poço. Após 24, 48 e 96h de infecção e

tratamento, foi realizada a extração de RNA apenas do lisado celular, através do Kit de Extração QIAampR Viral RNA (QIAGEN), com base no protocolo disponibilizado pelo fabricante. Resumidamente, 140µl do lisado celular foram adicionados a 560µl do tampão de lise AVL, seguidos de incubação à temperatura ambiente por 10min. Posteriormente, adicionou-se 600µl de etanol absoluto, seguido de homogeneização vigorosa das amostras. As amostras foram passadas pelas colunas de sílica (2x de 600µl) e centrifugadas a 4°C. Após as passagens, foram feitas as lavagens com tampão AW1 e AW2, com posterior eluição do RNA viral contido nas colunas usando 30µl de tampão AVE e armazenamento a -80°C.

#### **4.7.2. Análise de carga viral por RT-qPCR**

Os RNAs extraídos das amostras foi levado ao Laboratório Central do Distrito Federal (LACEN), onde foi realizada a RT-qPCR para quantificação do RNA do ZIKV, por método já estabelecido na literatura (101). Foram utilizados 5µl de amostra e um total de 20µl dos reagentes em uma microplaca óptica (PE AppliedBiosystems), os quais foram: 12,5µl de Master Mix (Promega – 2x), 1µl de Água Ultrapura, 1µl de Primer F ZIKV (Integrated DNA Technologies - 10µM), 1µl de Primer R ZIKV (Integrated DNA Technologies -10µM), 2µl da sonda GoTaq Probe qPCR (Promega), 1µl de Primer F RNase P (Thermo Fisher - 10µM), 1µl de Primer R RNase P (Thermo Fisher - 10µM), 0,5µl de enzima (Promega – 50x). Após adição das amostras e reagentes, a placa foi selada com o adesivo filme denominado OpticalAdhesive Cover (PE AppliedBiosystems) e conduzida para amplificação do material. A reação foi feita um passo único seguindo as especificações do fabricante, através do OneStep Real Time PCR System (AppliedBiosystem) e utilizando o LightCycler Systems (Roche). Foi usado um conjunto de primers provenientes da sequência gênica que codifica a proteína do envelope do ZIKV, amplamente utilizados na literatura, onde a sequência destes pode ser encontrada em Lanciotti et. al., 2008 (101). Como housekeeping gene foi utilizada à amplificação para RNase P; como controle positivo foram utilizadas amostras provenientes do cérebro de camundongos imunossuprimidos infectados com ZIKV; como controle negativo foram usadas amostras de soro de pacientes previamente diagnosticados negativos para este vírus. Para análise dos dados, o cycle threshold (Ct) considerado positivo foi entre

01 e 37. Para quantificação da carga viral por ml, foi realizada uma curva de titulação, na qual foram usadas diluições seriadas do ZIKV, sendo esta de titulação previamente conhecida.

#### **4.7.3. Título Viral pelo ensaio de TCID<sub>50</sub>**

As células SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 96 poços (n=6), em uma densidade celular de 60000 células por poço. As condições de tratamento foram pré-tratadas e, posteriormente, foram infectadas em 10 diluições diferentes do ZIKV ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ). Foram incubadas por 4 dias a 37°C, com monitoração constante acerca do efeito citopático e formação de placas que cada diluição do ZIKV é capaz de causar. A titulação por TCID<sub>50</sub>/ml foi calculada de acordo com o método de Reed and Muench (102), a fim de encontrar qual a diluição responsável em causar efeito citopático em 50% das células que foram infectadas. Após obtenção dos valores de TCID<sub>50</sub>, estes foram usados para predição de valores em PFU/ml pela distribuição de Poisson, no qual aborda que 0,7 PFU/ml = 1TCID<sub>50</sub> (103). Com isso, os títulos obtidos em TCID<sub>50</sub> foram multiplicados por 0,7 para obtenção dos valores em PFU/ml.

#### **4.8. Análises Estatísticas**

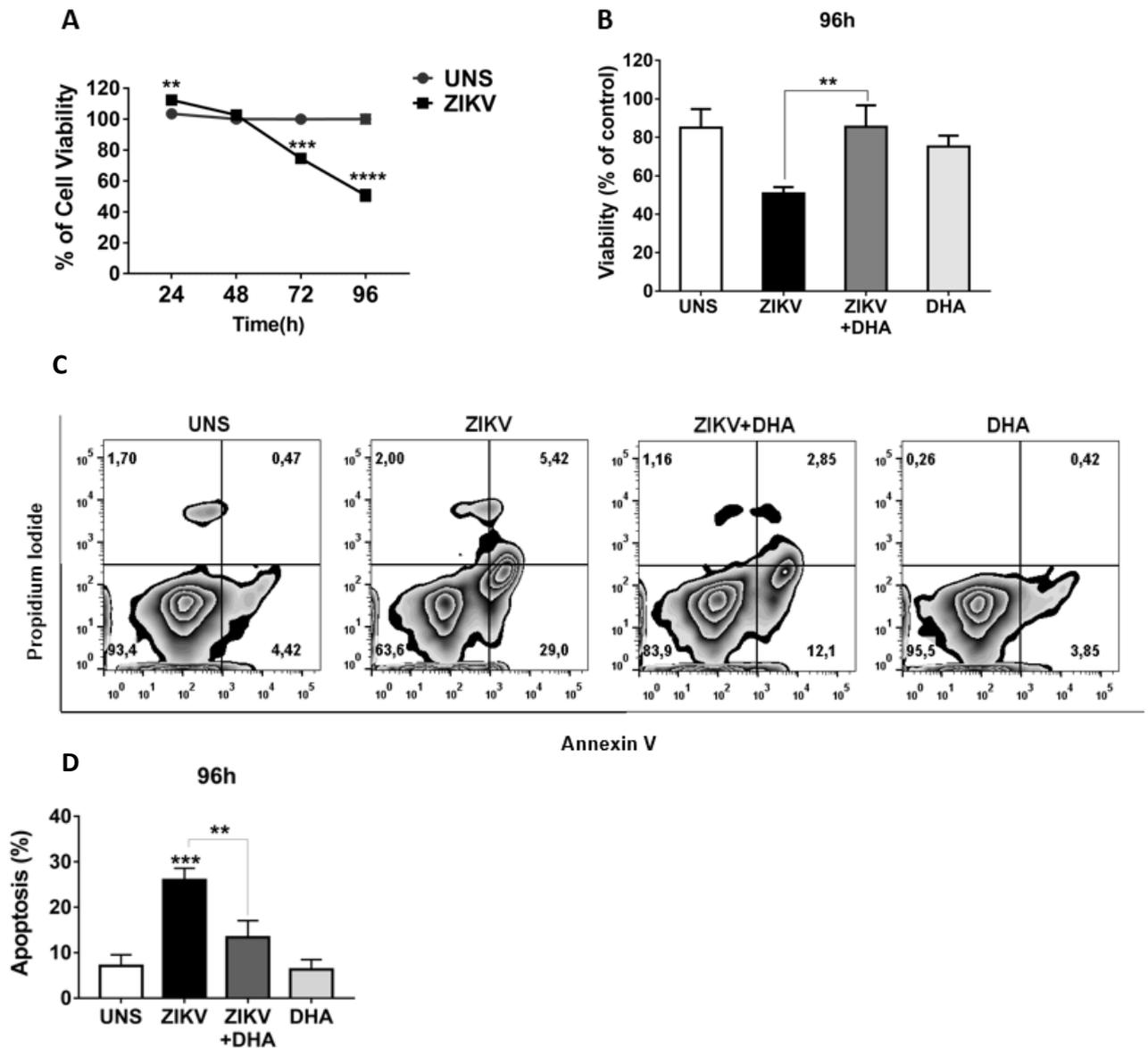
Os dados foram representados graficamente e analisados utilizando o software GraphPad Prism version 6.3 ou FlowJo version 10. A significância estatística de amostras com múltiplas variáveis foi analisada através do teste Two Way Anova, com pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $p \leq 0.05$ .

### **5. Resultados**

#### **5.1. O DHA protege contra a morte celular causada pelo ZIKV em células de neurônios humanos**

Sendo amplamente aplicado como modelo de célula *neuronal-like*, o neuroblastoma humano SH-SY5Y foi também utilizado com este propósito no presente trabalho, em sua forma nativa/não-diferenciada. Para encontrar o melhor

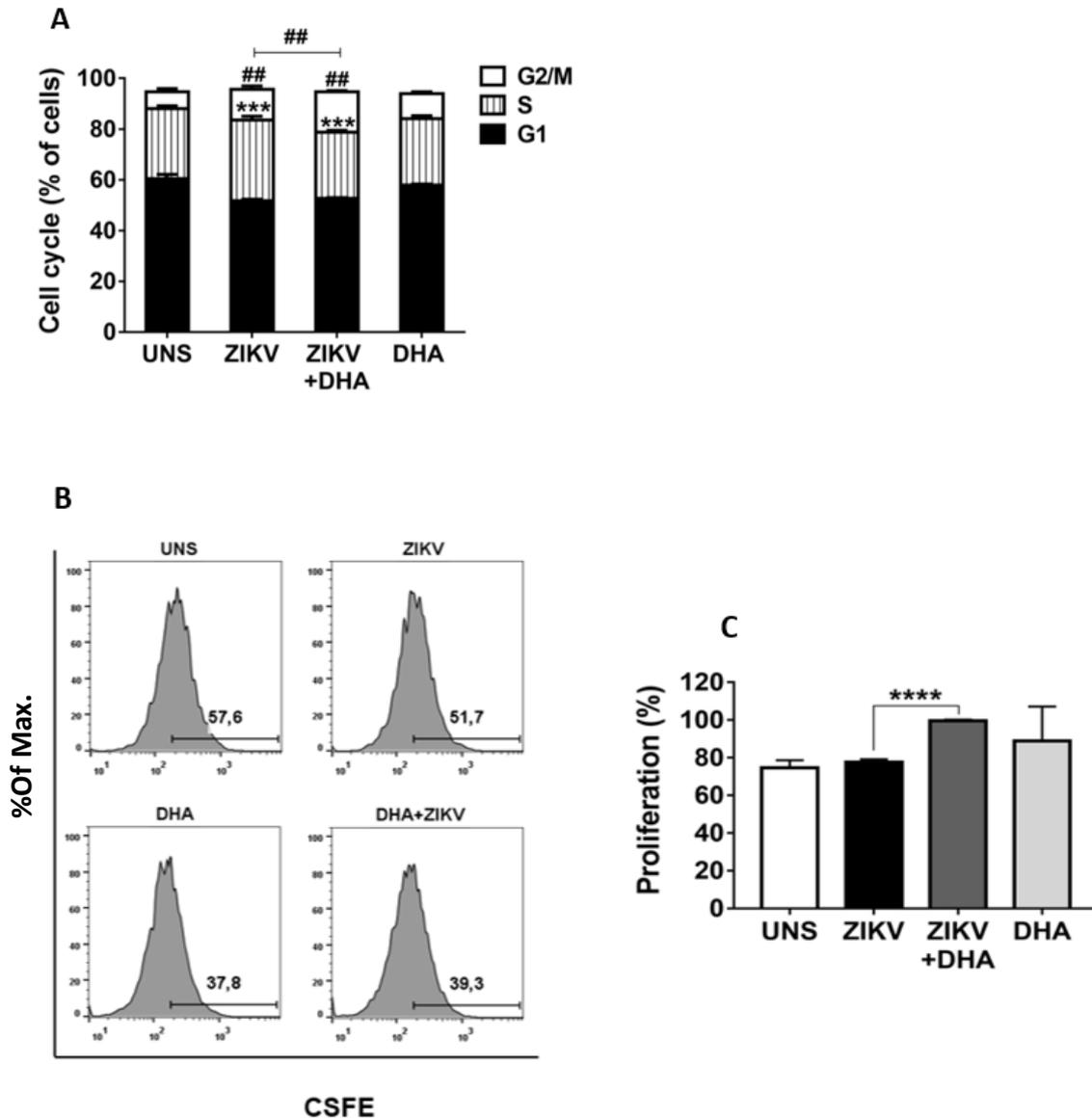
tempo para análise dos parâmetros de viabilidade e morte, as células foram infectadas com ZIKV na multiplicidade de infecção 10 (MOI 10) e após 24, 48, 72 e 96h, a viabilidade mitocondrial foi avaliada (Figura 4A). Nós observamos que o ZIKV reduz a viabilidade mitocondrial em tempos mais tardios, partindo de uma pequena modulação em 72h de infecção, e progredindo até cerca de 50% de perda neuronal em 96h de infecção. Considerando este resultado, nós avaliamos se o pré-tratamento com DHA poderia interferir nos efeitos danosos à viabilidade mitocondrial causados pela infecção. Após 96h de estímulo, constatou-se que o DHA é capaz de proteger significativamente contra a perda de viabilidade mitocondrial induzida pelo ZIKV em células neuronais (Figura 4B). Tendo este primeiro indício de proteção, nós avaliamos se o pré-tratamento com DHA poderia ter efeito especificamente contra a morte celular induzida pelo ZIKV através da marcação com Anexina-V e PI (Figura 4C). Após 96 horas de infecção, observou-se um aumento de cerca de 24% da população positiva de células para Anexina-V quando infectadas, demonstrando uma indução de morte por apoptose causada pelo vírus. Quando as células foram pré-tratadas com DHA previamente à infecção, observou-se redução de metade da população positiva para apoptose, o que foi posteriormente confirmado ter diferença estatística ao se plotar o gráfico de quantificação da marcação (Figura 4D).



**Figura 4: DHA protege contra o dano à viabilidade mitocondrial causado por ZIKV.** Viabilidade mitocondrial por MTT de células SH-SY5Y infectadas com ZIKV (MOI 10) e analisadas após 24, 48, 72 e 96h de infecção (a). Células SH-SY5Y pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10). Após 96h de infecção, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT (b) e a morte celular avaliada pela marcação de Anexina-V e PI (c). A quantificação da morte por apoptose foi representada em gráfico de barras (d). Cada um dos experimentos foi repetido pelo menos três vezes de forma independente. Todos os gráficos de barra foram gerados através do GraphPad Prism Version 6.3. O dotplot de citometria é o representativo e foi plotado utilizando FlowJo Version 10. Os valores significativos de P foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).

## **5.2. DHA aumenta a capacidade proliferativa de células neuronais infectadas com ZIKV**

Considerando a característica de proliferação celular ativa da linhagem neuronal, analisamos o impacto do pré-tratamento com DHA na progressão do ciclo celular, na presença e ausência da infecção com ZIKV. Além disso, averiguamos se a redução de viabilidade causada pelo ZIKV poderia ser através de uma parada ao ciclo celular, além do próprio processo de morte. Após 72h de infecção com ZIKV MOI 10, observamos que o ZIKV leva a um aumento sutil na porcentagem positiva de células para o ciclo G2/M comparado às células UNS. Ademais, as células infectadas previamente expostas ao DHA apresentaram um aumento significativo da porcentagem de células positivas na fase G2/M do ciclo celular quando comparadas tanto as infectadas sem DHA e as UNS (Figura 5A). Não foram observadas diferenças entre ZIKV e ZIKV+DHA nas fases S e G1. Complementar a este dado, foi avaliada a proliferação celular pelo ensaio de CFSE, onde este possui sua fluorescência reduzida à medida que a proliferação celular acontece, logo quanto menor a fluorescência, mais as células proliferaram. O dado foi demonstrado através do gráfico de porcentagem positiva de células para a marcação com CFSE (Figura 5B) e pela estimativa da capacidade proliferativa (Figura 5C). Após 96h de infecção (MOI 10), observamos que o ZIKV não modulou significativamente a proliferação da linhagem neuronal humana, contudo, quando exposto previamente ao DHA, constatamos um aumento da capacidade proliferativa na presença e ausência da infecção por ZIKV.



**Figura 5: DHA aumenta a capacidade proliferativa das células SH-SY5Y.** Células de neuroblastoma pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10). Após 72h de infecção, avaliou-se a progressão do ciclo celular pela marcação com PI e análise por citometria de fluxo (a). Após 96h de infecção, avaliou-se a proliferação celular pela marcação com CFSE (b) e a estimativa da capacidade proliferativa (c). Os gráficos de barra foram gerados através do GraphPad Prism Version 6.3. O histograma de citometria é o representativo e foi plotado utilizando FlowJo Ve10. Os valores significativos de P foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*). Os valores significativos associados à fase G2/M foram representados por cerquilha:  $p \leq 0.01$  (##),  $p \leq 0.001$  (###) e  $p \leq 0.0001$  (####).

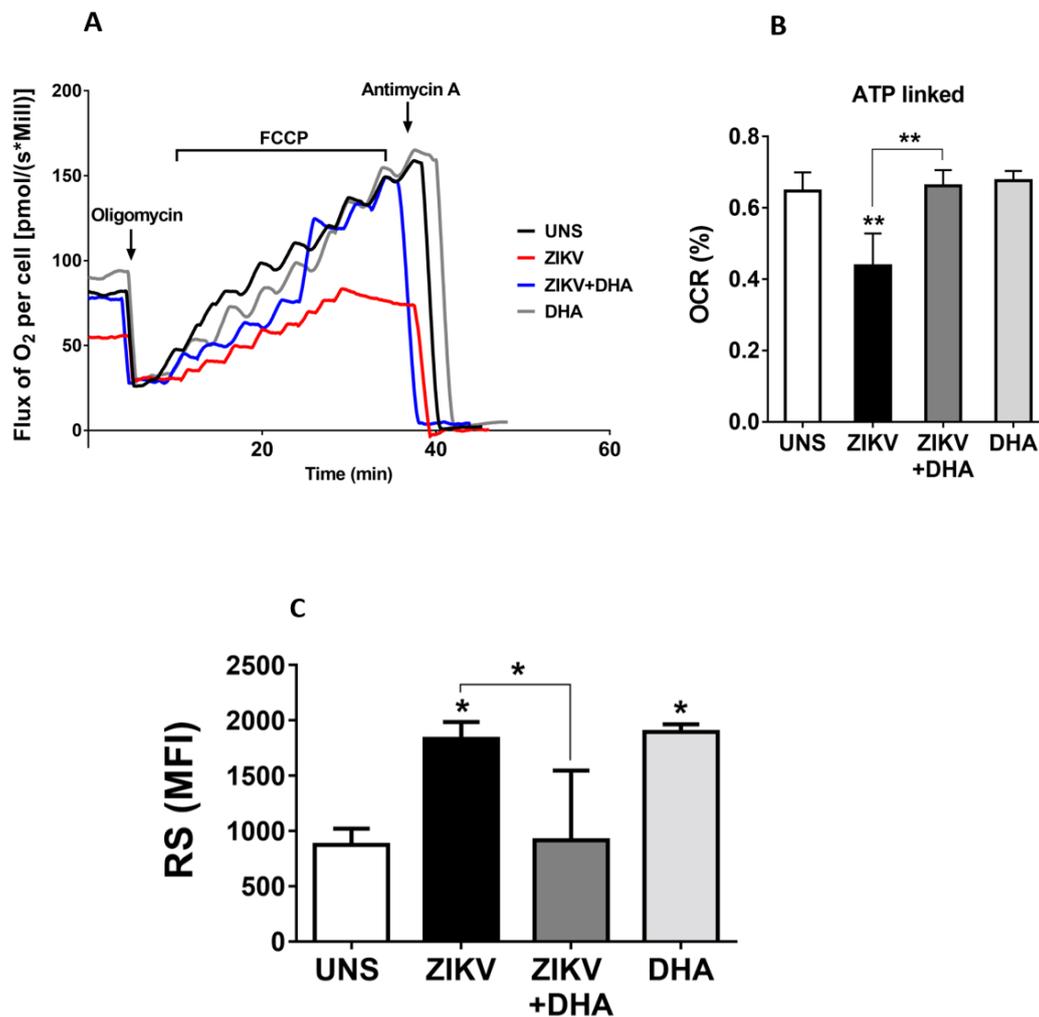
### 5.3.DHA previne da disfunção mitocondrial e estresse oxidativo causado pelo ZIKV em células neuronais

Para aprofundar os mecanismos associados à morte neuronal causada por ZIKV, bem como os indícios de redução de viabilidade mitocondrial observados na Figura 1, avaliamos o consumo de oxigênio e função mitocondrial através da respirometria de alta resolução (Figura 3A). A análise foi feita após 48h de infecção e tratamento, tempo este em que ainda não há morte celular causada pela infecção por ZIKV. Nós observamos que a respiração basal é menor nas células infectadas na ausência de DHA, em relação a todas as outras condições. Ademais, ao inibir a ATP sintase com oligomicina, é possível analisar o consumo de oxigênio diretamente associado à síntese de ATP (*ATP linked*). Observamos que a infecção com ZIKV sem DHA possui menor *ATP linked* comparado às outras condições, sendo este um grande indicativo de disfunção mitocondrial (Figura 6A e 6B). Ademais, ao se desacoplar o gradiente de prótons adicionando em pulsos o FCCP, a capacidade respiratória máxima foi obtida e observou-se que esta última é menor nas células infectadas com ZIKV sem DHA. A pré-exposição ao DHA antes da infecção fez com que a função mitocondrial fosse preservada quanto à respiração basal, consumo de oxigênio associado à síntese de ATP e à capacidade respiratória máxima, indicando que há proteção contra a disfunção mitocondrial e de possíveis distúrbios ao metabolismo pelo tratamento com DHA.

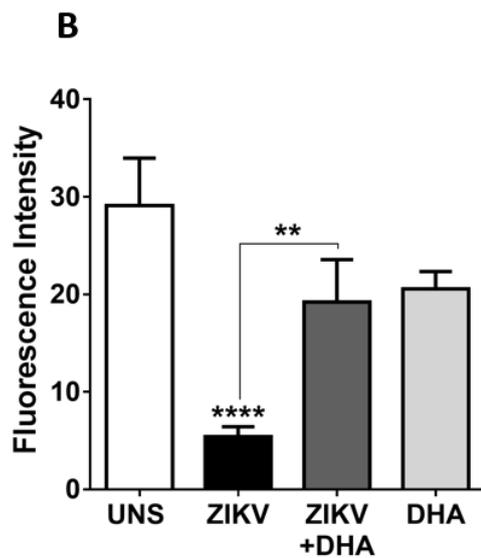
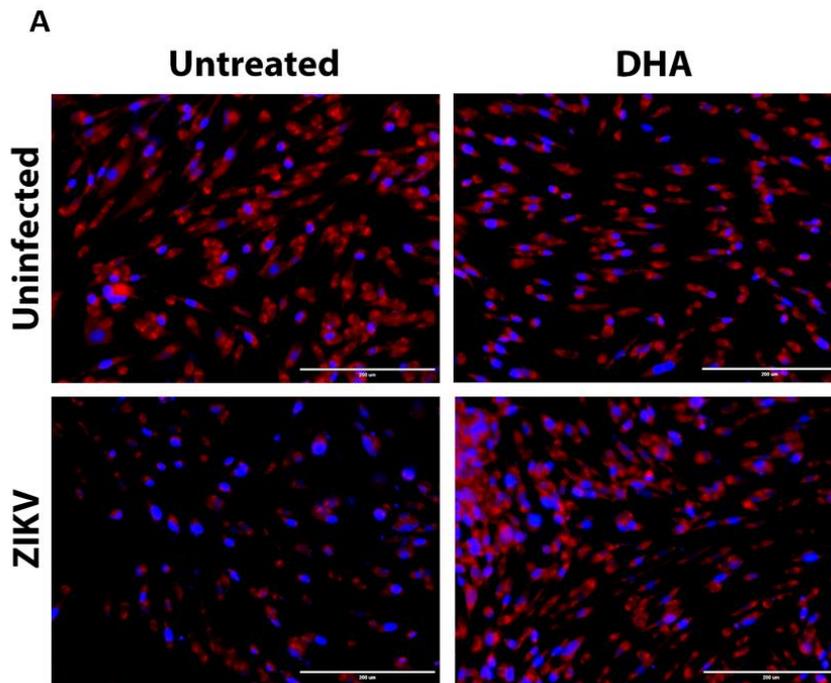
Avaliamos se além de causar disfunção mitocondrial o ZIKV também induziria um estresse oxidativo celular, utilizando a marcação de espécies reativas por DCF-DA (Figura 6C). Após 96h de infecção, observamos que o ZIKV induziu uma alta produção de espécies reativas (RS), a qual foi prevenida pelo pré-tratamento com DHA anterior à infecção. Curiosamente, quando as células foram expostas ao DHA na ausência da infecção, uma alta nas RS foi observada, demonstrando que a presença do vírus é capaz de influenciar na atividade que o DHA exerce na célula.

Após caracterizar a disfunção mitocondrial associada a infecção do ZIKV e o potencial protetivo do DHA neste processo, nós investigamos se haveria modulação da abundância de mitocôndrias de células viáveis, através marcação com MitoTracker e da visualização por microscopia de fluorescência (Figura 7A). 72h pós-infecção, observamos que a infecção do ZIKV na ausência de DHA leva

a uma notória redução no número de células viáveis, bem como redução na intensidade de fluorescência de forma significativa (Figura 7B), indicando redução da viabilidade mitocondrial. O pré-tratamento com DHA foi capaz de manter tanto o número de células, como a abundância de mitocôndrias viáveis durante a infecção com ZIKV, reforçando o caráter protetivo contra o dano mitocondrial. Estes dados corroboram com o ensaio de MTT, onde este mesmo evento de dano/proteção foi observado avaliando a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial (Figura 4B).



**Figura 6: O DHA previne contra a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo causados pelo ZIKV.** Células SH-SY5Y foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10). Após 48h, a taxa de consumo de oxigênio (OCR) (a) e o consumo de oxigênio associado à síntese de ATP (*ATP linked*) (b) foram analisados por respirometria de alta resolução, sob a ação dos inibidores Oligomicina (1.25 $\mu$ M), FCCP (100nM) e antimicina-A (2.5 $\mu$ M). Após 96h de infecção, a produção de RS foi avaliada usando DCF-DA e analisada por citometria de fluxo (c). Os gráficos foram gerados através do GraphPad Prism Version 6.3. Os valores significativos de P foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).

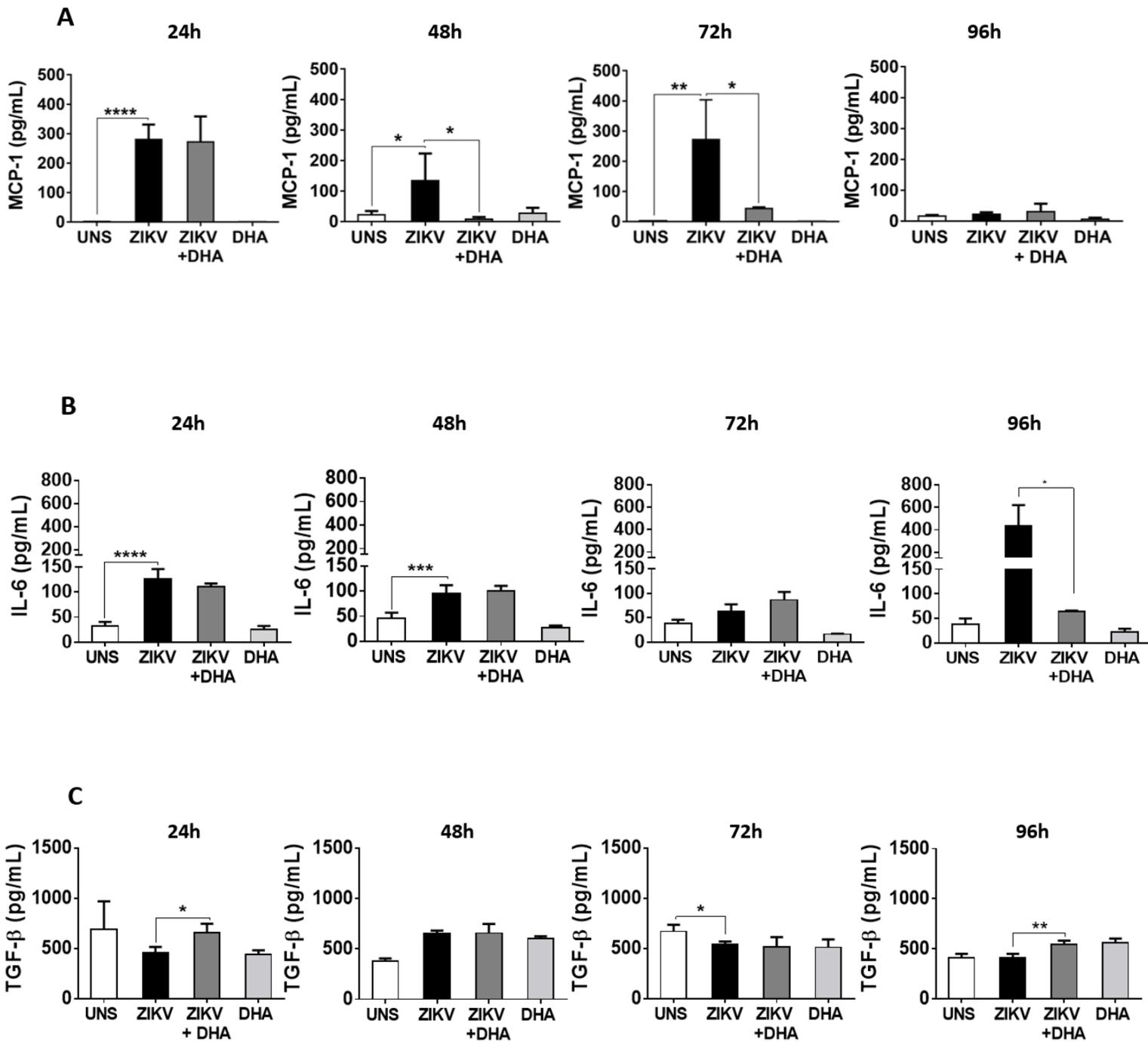


**Figura 7: DHA protege contra o dano mitocondrial causado pelo ZIKV.** Células SH-SY5Y foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10). Após 72h de infecção, mitocôndrias viáveis foram analisadas pela marcação com MitoTracker e analisadas por microscopia de fluorescência (a). A intensidade de fluorescência foi obtida com análise de experimentos independentes e quantificada usando ImageJ (b). Os valores significativos de P foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).

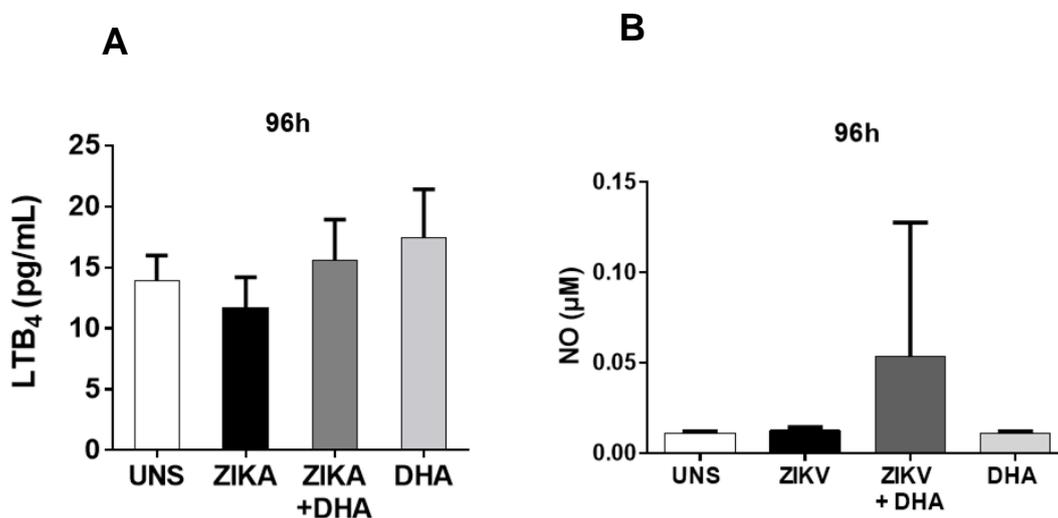
#### **5.4.DHA ameniza a resposta pró-inflamatória induzida pelo ZIKV em células neuronais**

O processo inflamatório exacerbado gera um microambiente desfavorável à sobrevivência celular. Durante a infecção pelo ZIKV, a neuroinflamação tem uma participação importante no estabelecimento do dano neural. Com base nisso, avaliamos se o pré-tratamento com DHA poderia ter um papel anti-inflamatório contra o ZIKV, analisando, após 24, 48, 72 e 96 de infecção, a secreção da quimiocina MCP-1 (Figura 8A) e das citocinas IL-6 (Figura 8B) e TGF- $\beta$  (Figura 8C). Observamos que o ZIKV, sem DHA, aumenta significativamente a produção dos agentes pró-inflamatórios IL-6 e MCP-1, desde os tempos iniciais. Em contrapartida, o pré-tratamento com DHA foi capaz de reduzir a secreção de MCP-1 em 48 e 72 horas, bem como amenizar a produção de IL-6 em 96h. Ademais, o pré-tratamento foi capaz de aumentar a secreção da citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$  em 24 e 72 horas pós-infecção.

Considerando trabalhos prévios que demonstram uma redução da biossíntese de mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico causada pela suplementação com DHA, nós avaliamos se este teria potencial de modular os níveis da molécula pró-inflamatória LTB<sub>4</sub>, produzida pela via de eicosanoides (Figura 9A). Nós observamos que não houve modulação deste eicosanoide em 96h em nenhuma das condições, sugerindo que o ZIKV não possua ação por esta via. Além disso, o DHA, neste tempo, também não teve impacto sob a biossíntese desse eicosanoide. Além disso, avaliamos também a formação de NO, sendo este outro importante marcador da resposta inflamatória e da citotoxicidade celular associada à sua produção não-controlada (Figura 9B). Observamos que o NO não foi modulado significativamente por nenhum dos estímulos, sendo necessárias análises em tempos distintos para confirmar qual o seu papel na patogênese do ZIKV.



**Figura 8: DHA ameniza o perfil pró-inflamatório durante a infecção com ZIKV.** O sobrenadante de células SH-SY5Y pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10) foram usados para dosagem da quimiocina MCP-1 (a) e das citocinas IL-6 (b) e TGF- $\beta$  (c) pela técnica de ELISA. Os gráficos foram gerados através do GraphPad Prism Version 6.3. Os valores significativos de P foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).

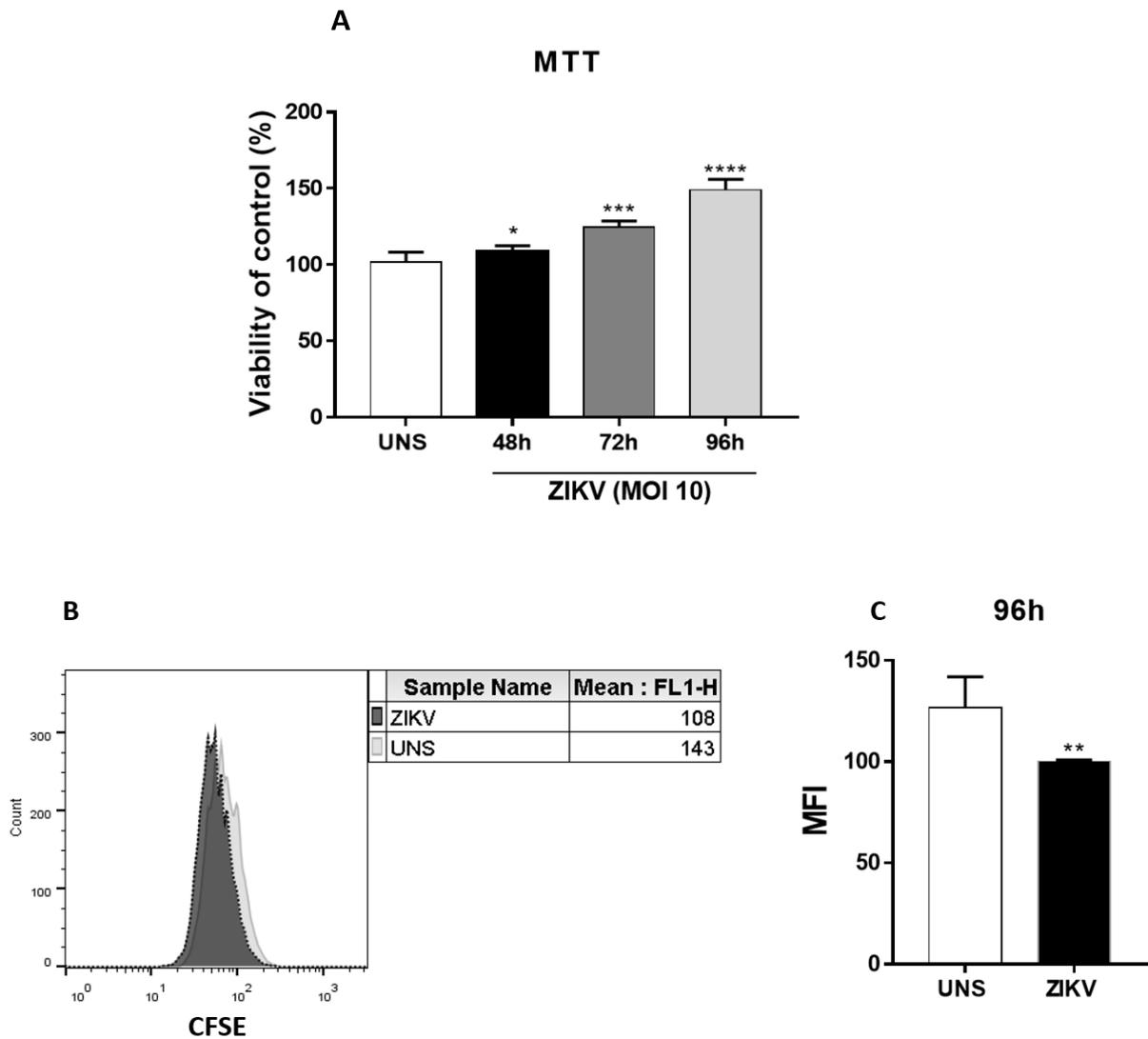


**Figura 9: Análise da produção de LTB<sub>4</sub> e NO durante a infecção por ZIKV e tratamento com DHA.** O sobrenadante de células SH-SY5Y pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5µM) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10) foram usados para dosagem do mediador lipídico Leucotrieno B<sub>4</sub> (a) e de óxido nítrico (b). Os gráficos foram gerados através do GraphPad Prism Version 6.3. Os valores significativos de P foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).

### 5.5. O DHA protege contra o aumento de viabilidade e proliferação celular da micróglia humana

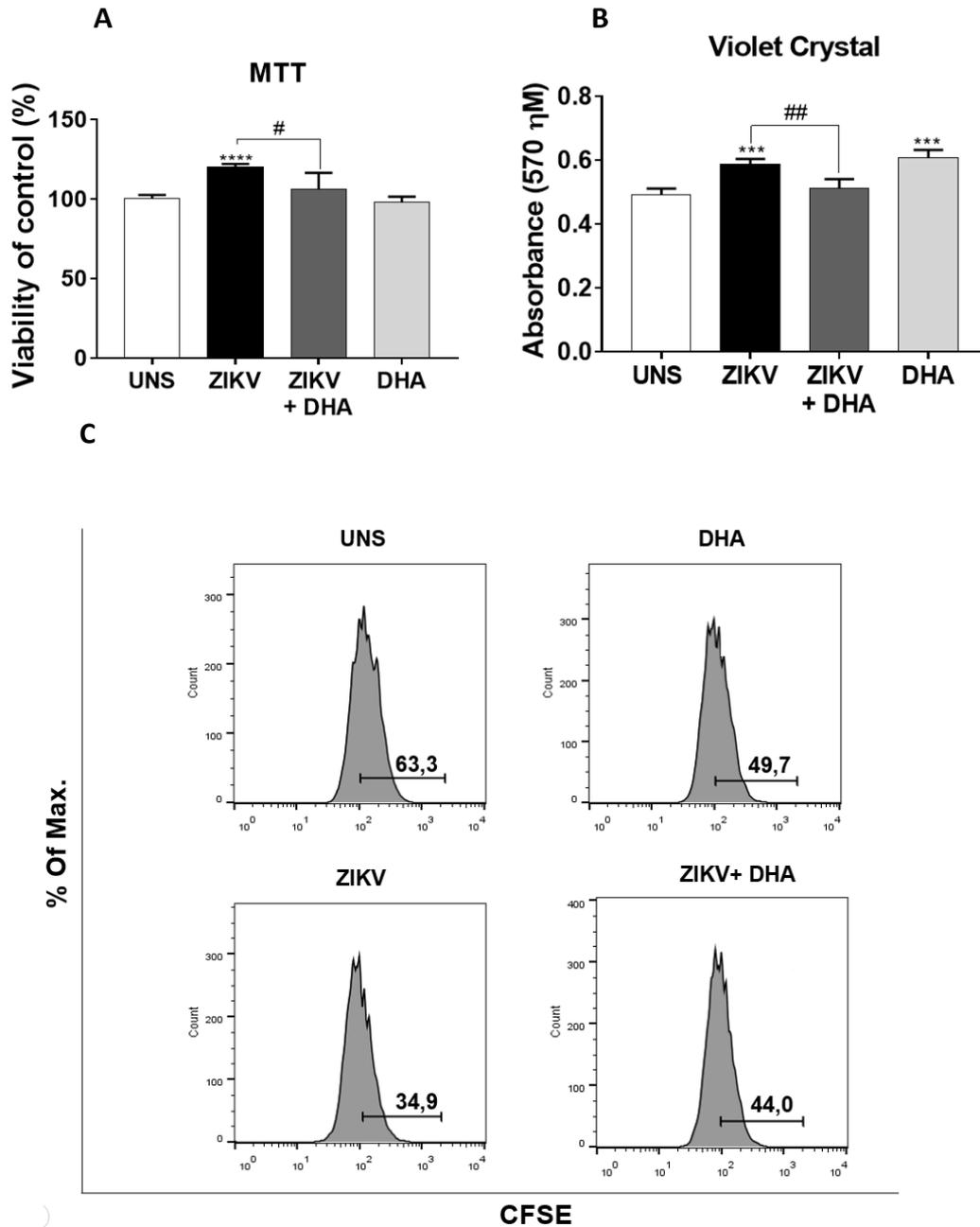
Considerando a importante influência do processo inflamatório nos danos neurais associados à infecção pelo ZIKV, analisamos a principal linha de frente que orchestra a inflamação do SNC, células microgliais humanas. A linhagem utilizada neste trabalho é denominada C20 e, até o momento, ainda são ausentes os dados de interação desta linhagem com o ZIKV, sendo necessários estudos iniciais para entender como as células responderão a este patógeno. Com isso, analisamos a modulação da viabilidade mitocondrial em 48, 72 e 96 horas pós-infecção (Figura 10A). Diferentemente do que foi observado com células de neuroblastoma, a micróglia teve sua viabilidade mitocondrial aumentada, de forma tempo dependente, durante a interação destas com o vírus Zika. Ponderando acerca de um indicativo de ativação microglial, analisamos também a proliferação após 96h de infecção (Figura 10B). Observou-se que, de fato, ZIKV leva a um aumento significativo da proliferação de células quando infectadas, apontado pela

redução da média de intensidade (MFI) de fluorescência do CFSE, indicando que estas respondem à infecção pelo ZIKV.



**Figura 10: ZIKV aumenta a viabilidade e proliferação da micróglia humana.** Células C20 foram infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10). Após 48, 72 e 96h de infecção, a viabilidade celular foi avaliada por MTT e analisada por espectrofotometria (a); após 96h de infecção, a proliferação celular foi avaliada por CFSE e analisada por citometria de fluxo (b). O gráfico com as médias de intensidade de fluorescência (MFI) obtidas em experimentos independentes foi gerado através do GraphPad Prism Version 6.3 (c). Os valores significativos de P foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).

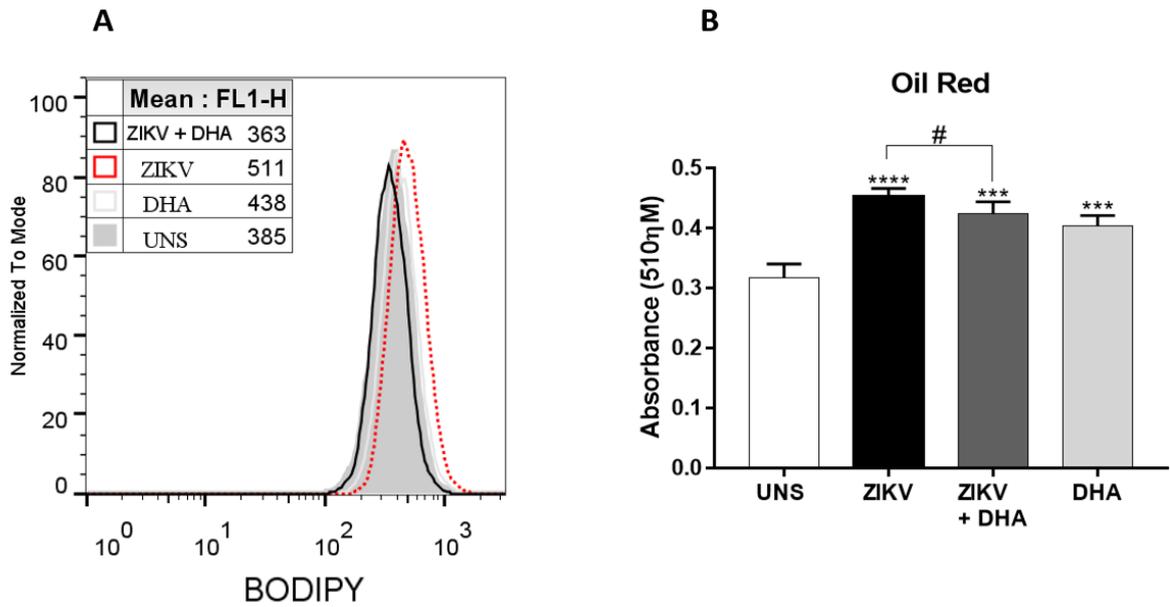
Com isso, avaliamos se o pré-tratamento com DHA seria capaz de interferir na modulação de viabilidade e proliferação causada pela infecção do ZIKV na micróglia humana. Como o aumento destes parâmetros podem estar correlacionados com a ativação desta célula imune, investigar a forma com que o DHA influencia neste processo é de relevância no quesito proteção do microambiente neural. Após 96h de infecção e pré-tratamento, avaliamos a viabilidade mitocondrial por MTT (Figura 11A) e a viabilidade celular por cristal violeta (Figura 11B). Observamos que as células infectadas na presença do DHA foram capazes de manter viabilidade mitocondrial e celular em estado basal, apresentando porcentagens semelhantes às células não-estimuladas e significativamente menores do que células infectadas na ausência do DHA. Além disso, ao avaliar o parâmetro de proliferação celular por CFSE (Figura 11C), observou-se que a exposição ao DHA anteriormente à infecção leva a um aumento sutil da porcentagem positiva de células quando comparadas às células infectadas sem tratamento, sugerindo uma redução na proliferação celular induzida por Zika.



**Figura 11: O DHA mantém a viabilidade celular e reduz a proliferação da microglia humana.** Células C20 foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10). Após 96h de infecção e tratamento, a viabilidade mitocondrial (a) e celular (b) foram avaliadas por MTT e cristal violeta respectivamente, e analisadas por espectrofotometria. Também foi avaliada a proliferação celular por CFSE, seguida de análise por citometria de fluxo. Os gráficos foram gerados usando GraphPad Prism 6.3 e FlowJo V10. Os valores significativos de P quando comparados às células UNS foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*). Os valores significativos de P entre as demais condições foram representados por cerquilhas:  $p \leq 0.01$  (##),  $p \leq 0.001$  (###) e  $p \leq 0.0001$  (####).

## **5.6. O DHA reduz a biogênese de corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo ZIKV**

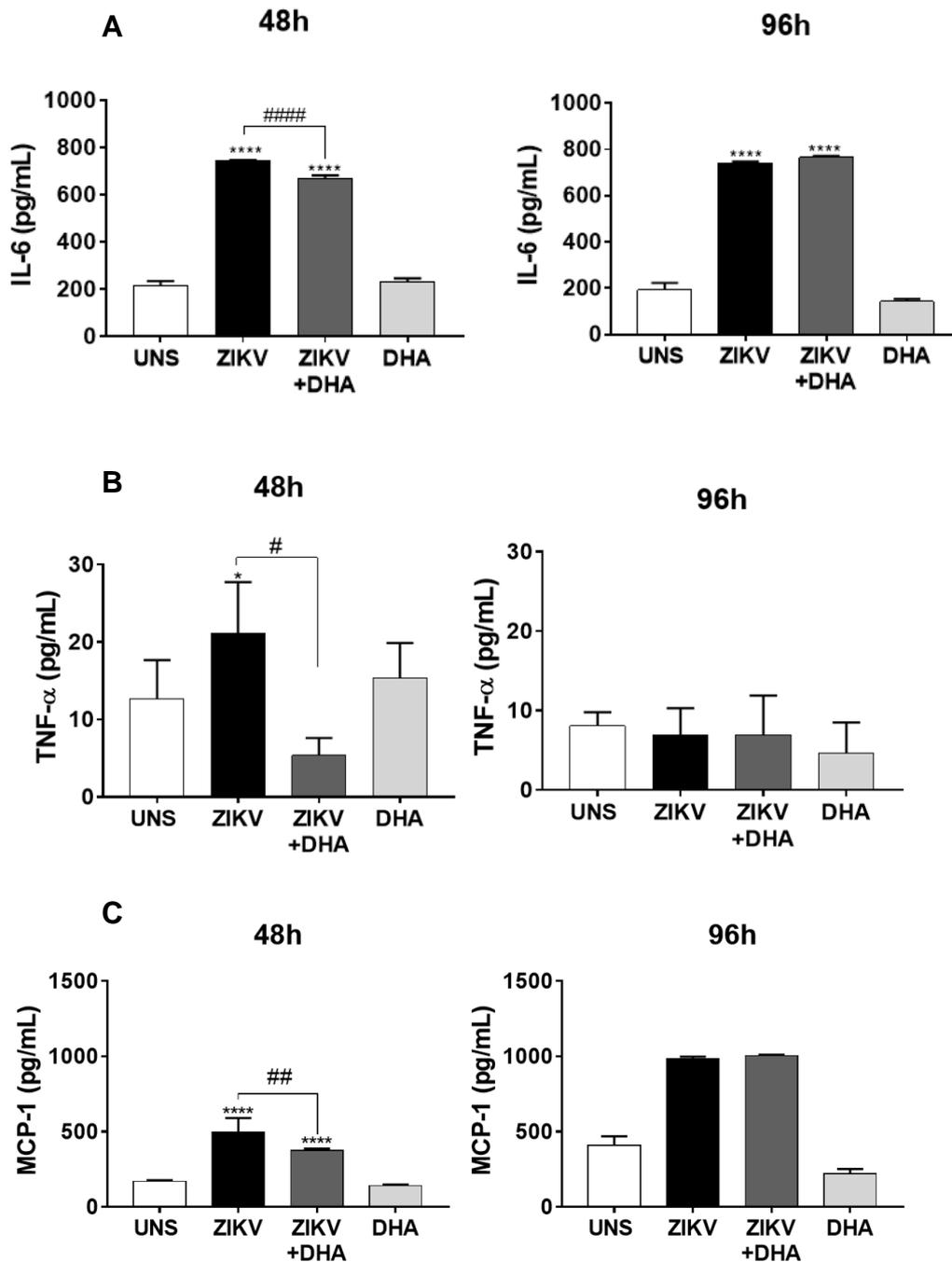
Após a análise dos resultados de viabilidade e proliferação, avaliamos diferentes fatores associados à ativação celular para melhor elucidar os mecanismos envolvidos neste processo durante a infecção pelo ZIKV, bem como a possível ação do DHA mitigando a inflamação causada por este patógeno. Iniciando por parâmetros gerais de ativação celular, avaliamos a biogênese de corpúsculos lipídicos, após 96h de infecção e estímulo, através da marcação com a sonda Bodipy (Figura 12A) e quantificação utilizando o corante Oil Red (Figura 12B). Nestes dados, observamos que a infecção pelo ZIKV aumenta a biogênese de corpúsculos lipídicos, apontado pelo aumento da fluorescência observado no gráfico A e da absorbância observada no gráfico B. Por sua vez, a presença do DHA, possivelmente por ser um lipídio, também aumenta essa biogênese de corpúsculos lipídicos comparado às células UNS; contudo, essa biogênese foi mitigada de forma significativa quando comparado às células infectadas com ZIKV sem tratamento, como apontado pelo gráfico quantitativo de Oil Red.



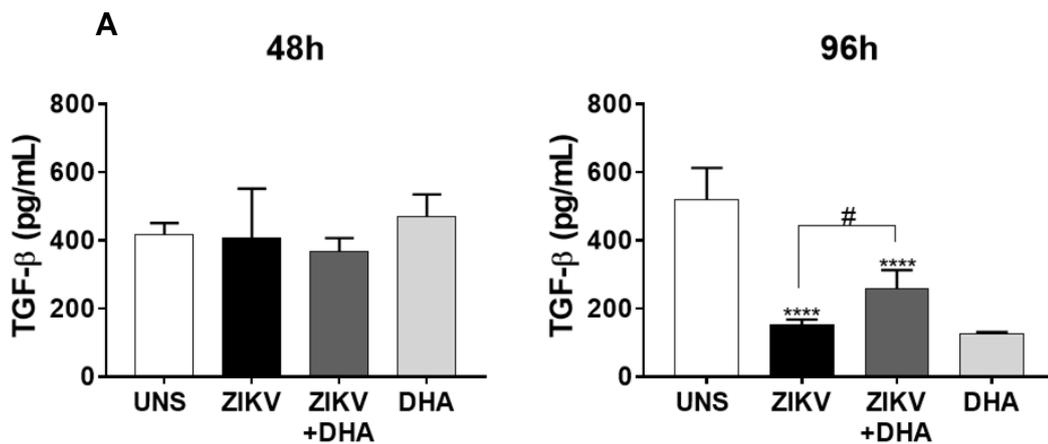
**Figura 12: Análise da biogênese de CL durante a infecção com ZIKV.** As células C20 foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5µM) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10). Após 96h, a biogênese de CL foi avaliada através da marcação com Bodipy (a) e pela quantificação usando o corante Oil Red, (b). Os gráficos foram gerados usando GraphPad Prism 6.3 e FlowJo V10. Os valores significativos de P quando comparados às células UNS foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*). Os valores significativos de P entre as demais condições foram representados por cerquilhas:  $p \leq 0.01$  (##),  $p \leq 0.001$  (###) e  $p \leq 0.0001$  (####).

### **5.7.O DHA é capaz de amenizar o processo pró-inflamatório da micróglia durante a infecção do ZIKV**

Explorando acerca do processo inflamatório microglial, analisamos marcadores solúveis, como citocinas e quimiocinas, que são demasiadamente importantes para elucidar o perfil de ativação de células imunes. Usando o sobrenadante da micróglia, a concentração de IL-6 (Figura 13A), TNF- $\alpha$  (Figura 13B), MCP-1 (Figura 13C) foi determinada pelo ensaio de ELISA. Após 48h, observamos que a infecção do ZIKV aumenta a produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e de MCP-1, importantes marcadores de um perfil de polarização microglial pró-inflamatório (M1). Por sua vez, a condição ZIKV+DHA foi capaz de reduzir moderadamente a produção de IL-6 e MCP-1, mas drasticamente a produção de TNF- $\alpha$  no tempo de 48h. No tempo de 96h não foi observada modulação destas citocinas pelo DHA na presença de ZIKV. Como um marcador de perfil anti-inflamatório (M2), avaliamos a produção da citocina TGF- $\beta$  por ELISA (Figura 14A). Após 96h, observamos que o ZIKV reduziu a citocina TGF- $\beta$  e a condição ZIKV+DHA levou ao aumento parcial desta citocina, demonstrando que o pré-tratamento é capaz de reduzir fatores pró-inflamatórios e induzir a citocina anti-inflamatória durante a infecção do ZIKV.



**Figura 13: A modulação de IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 durante a infecção do ZIKV e tratamento com DHA.** Células C20 foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV MOI 10. Após 48 e 96h de estímulo e infecção, a dosagem de IL-6 (a), TNF- $\alpha$  (b), MCP-1 (c) foi feita pela técnica de ELISA. Os gráficos foram gerados usando GraphPad Prism 6.3. Os valores significativos de P quando comparados às células UNS foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*). Os valores significativos de P entre as demais condições foram representados por cerquilhas:  $p \leq 0.01$  (##),  $p \leq 0.001$  (###) e  $p \leq 0.0001$  (####).



**Figura 14: Modulação da citocina TGF- $\beta$  durante a infecção com ZIKV e tratamento com DHA.** Células C20 foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV MOI 10. Após 48 e 96h de estímulo e infecção, a dosagem de TGF- $\beta$  foi executada pela técnica de ELISA. Os gráficos foram gerados usando GraphPad Prism 6.3. Os valores significativos de P quando comparados às células **UNS** foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*). Os valores significativos de P entre as demais condições foram representados por cerquilhas:  $p \leq 0.01$  (##),  $p \leq 0.001$  (###) e  $p \leq 0.0001$  (####).

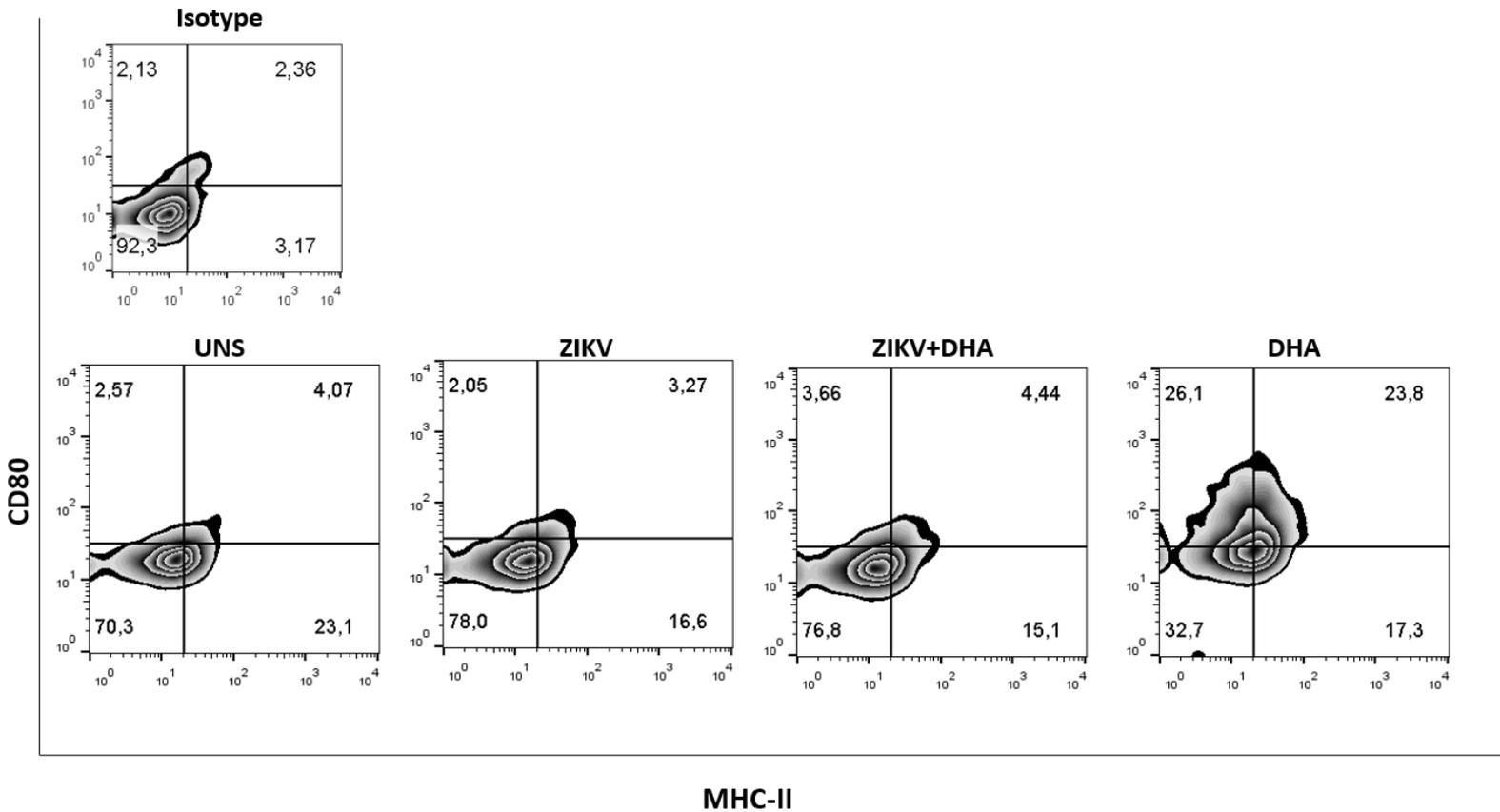
## **5.8. O DHA modula o perfil de apresentação de antígenos lipídicos e peptídicos da micróglia**

A fim de avaliar como a infecção e o tratamento com DHA são capazes de influenciar no processo de apresentação antigênica pela micróglia humana, processo fundamental para construir a ponte entre a resposta imune inata para a resposta adaptativa efetora, analisamos a modulação de marcadores de apresentação de antígenos peptídicos e lipídicos. Após 24h de tratamentos e infecção, analisamos a expressão de MHC-II e da molécula coestimuladora CD80 na superfície de células microgлияis (Figura 15A). Observamos que a infecção do ZIKV não modulou a porcentagem de células positivas para MHC-II e CD80. Curiosamente, o pré-tratamento com DHA na ausência da infecção foi capaz de aumentar em aproximadamente 7 vezes a porcentagem de células duplamente positivas, indicando o aumento da expressão de ambos os marcadores. Além disso, é possível observar um aumento considerável de CD80, uma vez que a porcentagem de células dentro do quadrante dessa marcação isolada também aumentou em 23% em comparação às células UNS. Contudo, essas modulações não foram observadas nas células tratadas com DHA e infectadas com ZIKV, sugerindo que o vírus possa, de alguma forma, impedir a ativação dessa via de apresentação antigênica.

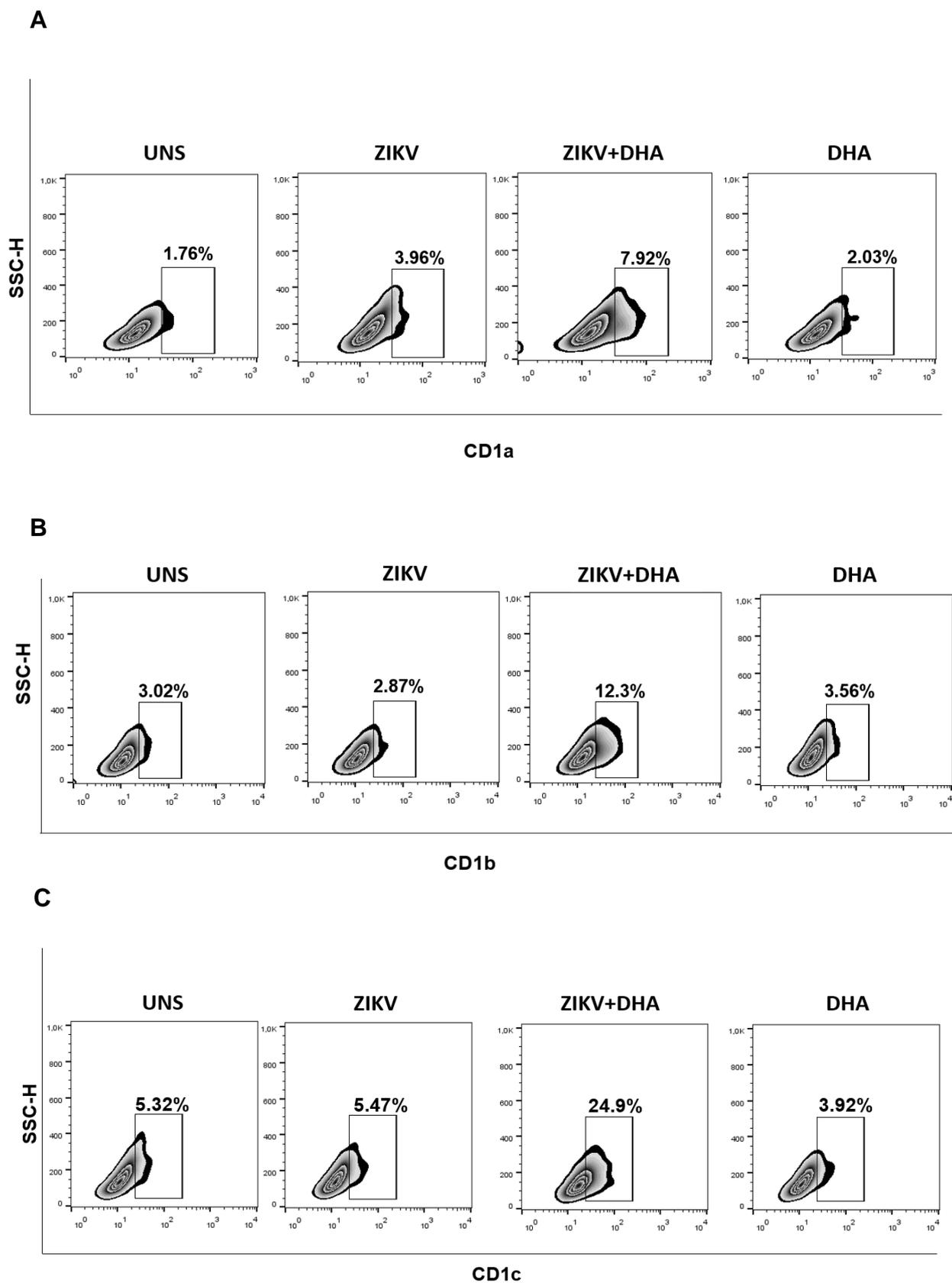
Complementar às análises da micróglia em sua função de APC, avaliamos a modulação de proteínas associadas à apresentação de antígenos lipídicos por citometria de fluxo. Após 48h de infecção e tratamentos, avaliamos a expressão de CD1a, CD1b e CD1c na superfície das células microgлияis. Observamos que a porcentagem positiva de para CD1a aumentou de forma sutil pela infecção do ZIKV e o pré-tratamento com DHA, na presença de ZIKV, aumentou ainda mais este marcador (Figura 16A). Observamos também uma modulação sutil (9%) na porcentagem positiva de células para CD1b, especificamente em células pré-tratadas e infectadas com ZIKV, quando comparadas às outras condições (Figura 16B). Além disso, verificamos uma modulação ainda mais notável da expressão de CD1c, onde há um aumento de 19% na porcentagem positiva de células exclusivamente quando pré-tratadas com DHA e infectadas com ZIKV (Figura

16C), comparadas às outras condições, demonstrando que a apresentação de antígenos lipídicos é modulada pelo DHA durante a infecção do ZIKV.

A



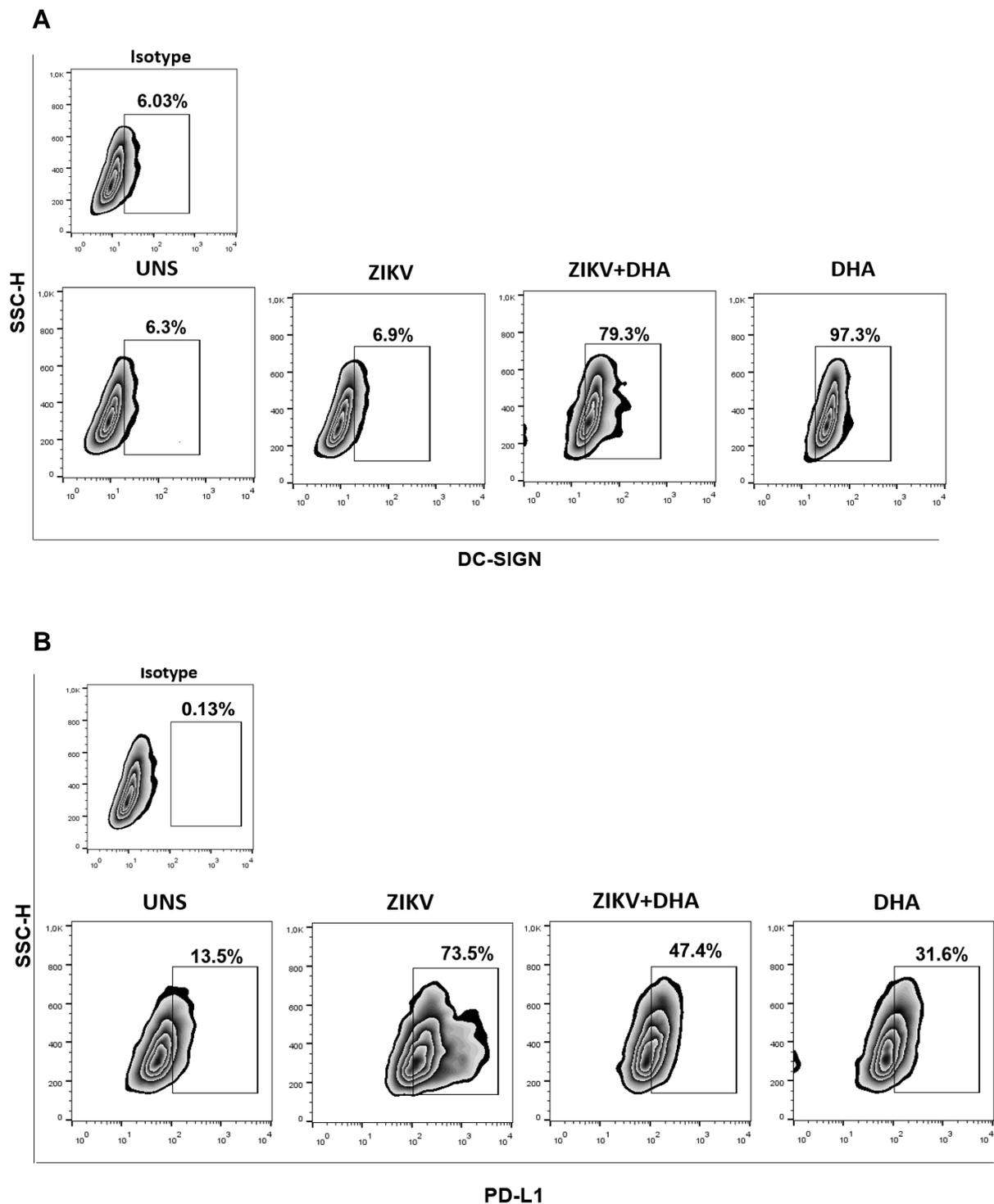
**Figura 15: Apresentação de antígenos peptídicos durante a infecção pelo ZIKV e tratamento com DHA.** Células C20 foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10). Após 24h de infecção e tratamento, a expressão de MHC-II e CD80 foi analisada por citometria de fluxo. Os gráficos foram gerados usando o software FlowJo V10.



**Figura 16: Apresentação de antígenos lipídicos durante a infecção do ZIKV e tratamento com DHA.** Células C20 foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10). Após 72h de infecção e tratamento, a expressão de CD1a (a), CD1b (b) e de CD1c (c) foi analisada por citometria de fluxo. Os gráficos foram gerados usando o software FlowJo V10. O quadrante representa a % positiva de células para as respectivas marcações de cada gráfico.

### **5.9. O pré-tratamento com DHA e a infecção pelo ZIKV modulam moléculas regulatórias na superfície de micróglia**

A fim de analisar a expressão de outras moléculas com função regulatória na membrana de células microglicais, avaliamos a modulação de DC-SIGN, uma importante proteína associada à polarização de um perfil anti-inflamatório (M2) da micróglia (Figura 17A). Observamos que o pré-tratamento com DHA foi capaz de aumentar em mais de 70% a positividade de células para DC-SIGN, demonstrando que o lipídeo induz parâmetros associados a um perfil anti-inflamatório na micróglia. Curiosamente, a porcentagem de células positivas na condição tratada e infectada (ZIKV+DHA), mesmo que maior em comparação às UNS e infectadas na ausência de DHA, apresentou uma redução de 18% comparada às células tratadas sem infecção. Complementar à expressão de DC-SIGN, avaliamos a expressão de PD-L1, um ligante expresso na membrana de diversas células, como as células microglicais, que possui alta capacidade de supressão da resposta linfocitária (Figura 17B). Observamos que o ZIKV na ausência de DHA foi capaz de aumentar em 70% a porcentagem de células positivas para PD-L1, indicando um alto potencial da micróglia em suprimir a resposta imune adaptativa por este mecanismo. Por sua vez, a condição ZIKV+DHA obteve uma redução de 26% na porcentagem positiva de células, redução a qual foi ainda maior quando as células são tratadas sem posterior infecção. Esse conjunto de dados indica que apesar de o tratamento com DHA induzir um perfil anti-inflamatório, este não torna a micróglia totalmente supressora dessa resposta, fator essencial para o próprio combate ao ZIKV.



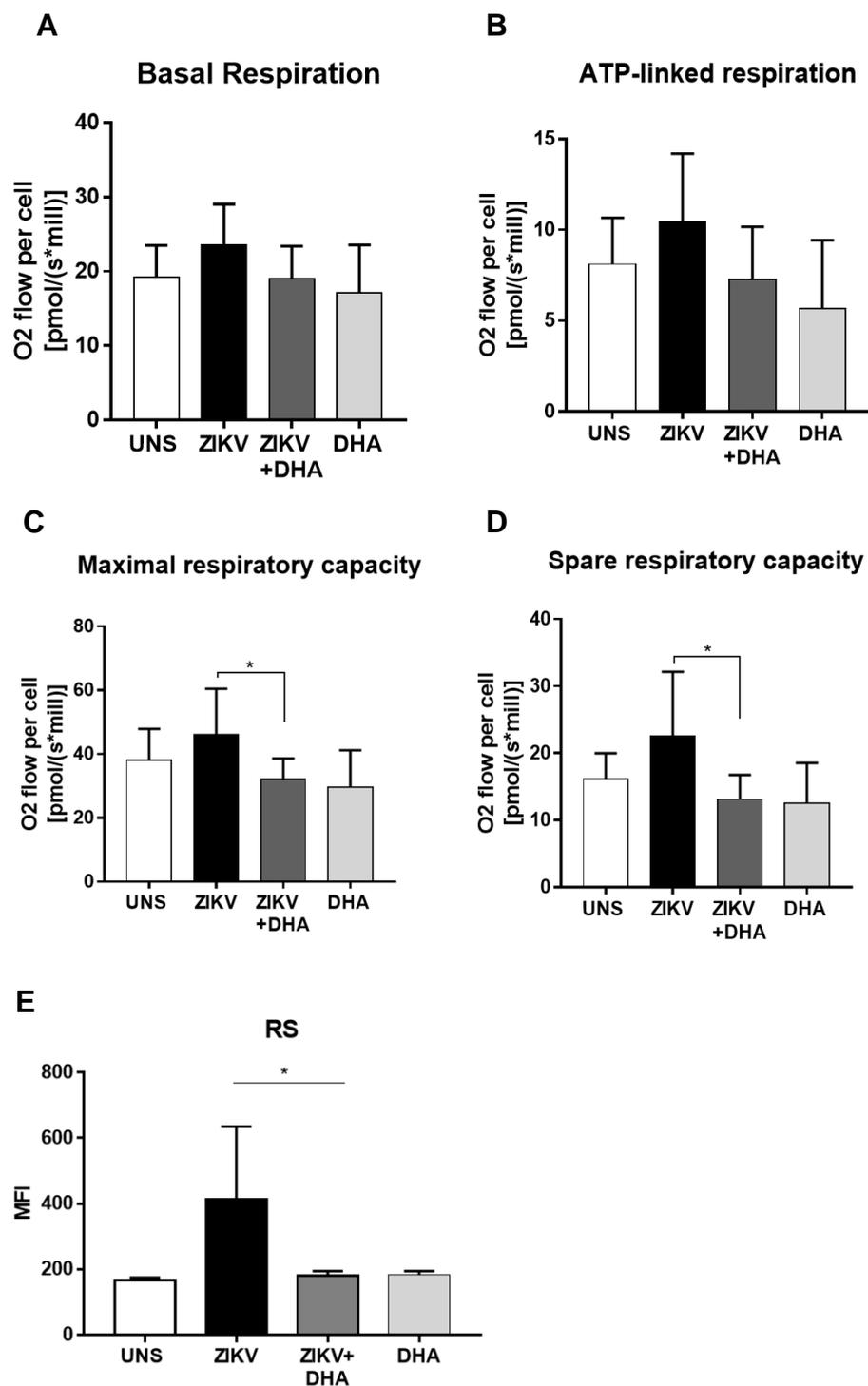
**Figura 17: Modulação de proteínas regulatórias durante a infecção do ZIKV e tratamento com DHA.** Células C20 foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10). Após 24h de infecção e tratamento, a expressão de DC-SIGN (**a**) e de PD-L1 (**b**) foi analisada por citometria de fluxo. Os gráficos foram gerados usando o software FlowJo V10. O quadrante representa a % positiva de células para as respectivas marcações de cada gráfico.

### **5.10. Modulação da função mitocondrial pelo ZIKV e tratamento com DHA na micrógliã**

Após analisar as alterações no perfil de ativação da micrógliã, se torna relevante verificar se a função mitocondrial também pode ser modulada neste processo. Após 48h de infecção e tratamento, diferentes parâmetros foram obtidos através da respirometria de alta de resolução, a qual avalia o fluxo de oxigênio sob diferentes inibidores que agem na fosforilação oxidativa. Observamos que a respiração basal (ou de rotina) não foi modulada durante a infecção pelo ZIKV e o pré-tratamento com DHA também não teve efeito neste parâmetro (Figura 18A). Apesar da infecção pelo ZIKV sugerir um aumento no fluxo de oxigênio acoplado à síntese de ATP (*ATP-linked*), nenhuma diferença significativa foi observada quando comparamos às células não-estimuladas ou infectadas na presença de DHA (Figura 18B). Contudo, ao avaliarmos a capacidade respiratória máxima, observamos que há uma redução deste parâmetro em células infectadas na presença de DHA, comparado à infecção na ausência deste (Figura 18C). Essa mesma redução da capacidade respiratória não foi observada ao se comparar células pré-tratadas com DHA e células não-estimuladas (controle). Além disso, também observamos uma redução da capacidade de reserva (*Spare Respiratory Capacity*) quando pré-tratamos as células com DHA em comparação às células infectadas sem o tratamento (Figura 18D). Apesar da redução na capacidade de reserva e da capacidade respiratória máxima serem associadas a parâmetros que apontam disfunção mitocondrial, não obtivemos alterações significativas entre o tratamento com DHA e células não-estimuladas (controle). Esse resultado sugere que, possivelmente, o tratamento com DHA apresenta uma modulação da atividade oxidativa da micrógliã, a qual se difere das causadas pelo ZIKV, mas se assemelha às células controle, demonstrando ausência de dano à função mitocondrial.

Para complementar as análises acerca da função mitocondrial e entender melhor a modulação do DHA, avaliamos também a produção de espécies reativas (RS), marcando as células com a sonda DCF-DA 48h pós-infecção e estímulo. Curiosamente, verificamos que apesar de a infecção pelo ZIKV não causar disfunção mitocondrial aparente pelos ensaios de respirometria, uma intensa produção de RS foi induzida por este patógeno nas células microgliciais (Figura 18E). Por sua vez, o DHA foi eficaz em prevenir a formação exacerbada de RS

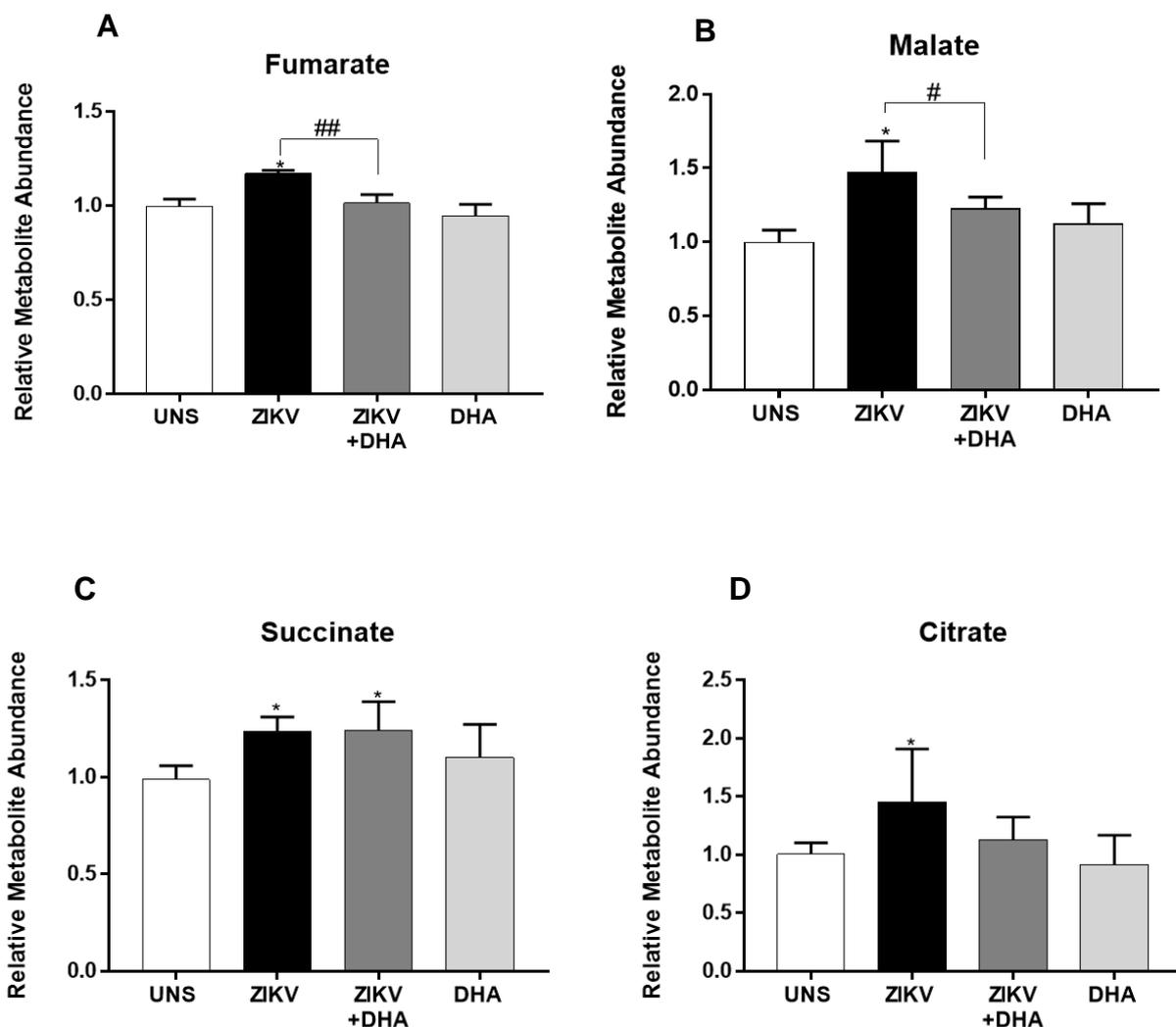
durante a infecção, tendo papel importante contra o estresse oxidativo celular. Esse resultado fortalece a hipótese de que o DHA altera a atividade oxidativa da micróglia de forma protetiva contra modulações do ZIKV, necessitando de análises mais acuradas para conclusões acerca desta modulação.



**Figura 18: Avaliação da função mitocondrial da micróglia por respirometria de alta resolução.** Células C20 foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV MOI 10. Após 48h de estímulo e infecção, as análises acerca da respiração basal (a), respiração acoplada à síntese de ATP (*ATP-linked*) (b), capacidade respiratória máxima (c) e a capacidade respiratória de reserva (d) foram executadas por respirometria de alta resolução, sob a ação dos inibidores Oligomicina (1.25 $\mu$ M), CCCP (100nM) e antimicina-A (2.5 $\mu$ M). A produção de RS foi avaliada por marcação com DCF-DA e analisada com base na Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) (e). Os gráficos foram gerados através do GraphPad Prism Version 6.3. Os valores significativos de P foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).

### **5.11. Os intermediários do ciclo do ácido cítrico são modulados durante a infecção do ZIKV e tratamento com DHA**

Um dos processos comumente observados em células microgliais quando ativadas, é o acúmulo de diferentes intermediários do ciclo tricarboxílico (TCA), ou Ciclo do Ácido Cítrico, em decorrência de uma intensa reprogramação metabólica que leva ao funcionamento anormal desta via. Com isso, para avaliar como o metabolismo microglial se comporta acerca da infecção do ZIKV e tratamento com DHA, avaliamos alguns intermediários do TCA através da análise de monitoramento de íon selecionado (*Selected Ion Monitoring-SIM*) por GC-MS. Detectamos a abundância relativa dos ácidos orgânicos Fumarato (Figura 18A), Malato (Figura 18B), Succinato (Figura 18C) e Citrato (Figura 18D) após 48h de infecção e estímulos. Observamos que o ZIKV leva ao aumento dos quatro intermediários do ciclo TCA, quando comparado às células UNS, demonstrando o alto potencial do vírus em modular diferentes vias metabólicas da célula e influenciar no processo de ativação da micróglia também por este mecanismo. Em contrapartida, o pré-tratamento com DHA foi capaz de impedir o aumento de dois dos intermediários durante a infecção, sendo estes fumarato e malato, mantendo em níveis similares aos encontrados em células UNS. Apesar do papel importante do citrato na regulação e alteração de vias metabólicas, diferenças estatísticas entre ZIKV e ZIKV+DHA não foram observadas para este intermediário.



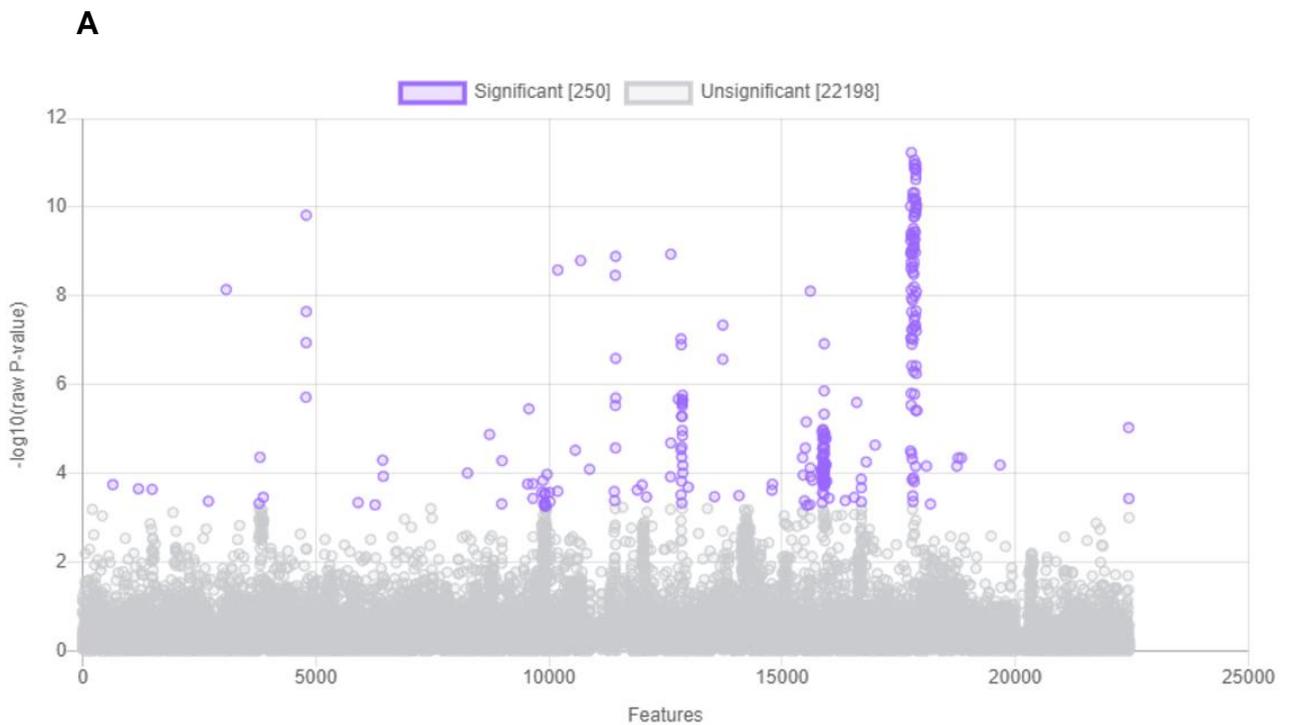
**Figura 19: Modulação de intermediários do Ciclo do Ácido Cítrico pela infecção do ZIKV e tratamento com DHA.** Células C20 foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV MOI 10. Após 48h de estímulo e infecção, a abundância de fumarato (a), malato (b), succinato (c) e citrato (d), foi acessada utilizando GC-MS. Os gráficos foram gerados usando GraphPad Prism 6.3. Para o cálculo de abundância relativa, foi utilizado o ribitol como padrão. Os valores significativos de P quando comparados às células UNS foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*). Os valores significativos de P entre as demais condições foram representados por cercilhas:  $p \leq 0.01$  (##),  $p \leq 0.001$  (###) e  $p \leq 0.0001$  (####).

## 5.12. O ZIKV e DHA modulam o perfil metabólico global da micróglia

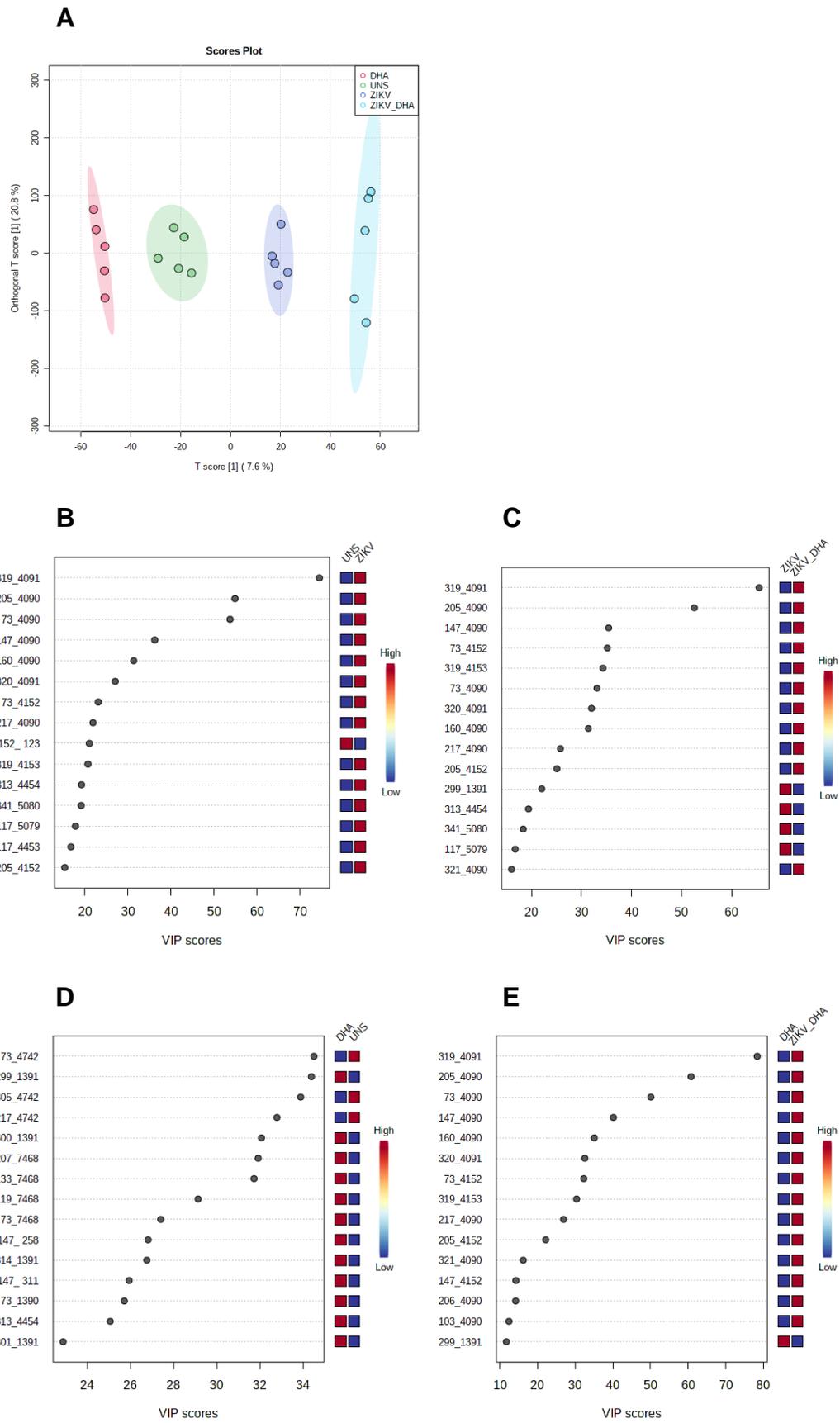
Para avaliar a modulação do perfil metabólico global da micróglia quando infectada com ZIKV e tratada com DHA, foi utilizada a análise de GC-MS para detecção de diferentes metabólitos. Ao todo, foram identificadas 22448 variáveis, entre as quais 250 foram moduladas diferencialmente entre os grupos, com  $p \leq 0.05$  (Figura 20A). Para obter informação acerca da distinção entre os grupos experimentais, realizamos a análise de projeções ortogonais para análise discriminante de estruturas latentes (OPLS-DA). Também avaliamos o grupo de metabólitos que impulsionam a separação dos grupos observada pelo OPLS-DA, tendo estes plotados na forma pontuação de VIP (*VIP score*). A análise de OPLS-DA revelou que há uma separação distinta do perfil metabólico entre os quatro grupos experimentais (UNS, ZIKV, ZIKV+DHA e DHA) (Figura 21A). Curiosamente, os grupos com maior distanciamento entre si apontado pelo OPLS-DA foram as condições DHA e DHA+ZIKV, demonstrando que a presença do vírus impacta fortemente as modulações metabólicas induzidas pelo DHA.

Comparando células UNS e infectadas com ZIKV (sem DHA), avaliamos quais foram os principais metabólitos envolvidos na separação dos grupos, plotados na forma de *VIP score* (Figura 21B). Apesar da identificação completa dos metabólitos estar em andamento, identificamos a glicose (319\_4090) como o metabólito que mais influencia a separação dos grupos, com maior abundância nas células infectadas comparado às células controle (Figura 21B). Além disso, observamos um aumento da abundância de ácidos orgânicos, como o ácido palmítico (313\_4454), nas células infectadas com ZIKV. Quando comparamos células infectadas com ZIKV na ausência e na presença de pré-tratamento com DHA, a identificação dos metabólitos do *VIP score* revelou maior abundância de glicose (319\_4091) em células com DHA, comparado às infectadas na ausência deste (Figura 21C). Em contrapartida, alguns metabólitos apresentaram menor abundância na condição ZIKV+DHA, como o fosfato (299\_1391) e o ácido palmítico (313\_4454). Alguns outros ácidos orgânicos também foram apontados, contudo, uma identificação mais acurada ainda está em andamento.

Para entender os efeitos do DHA por si só na modulação do metabolismo da microglia, comparamos também células não-estimuladas e células pré-tratadas sem ZIKV. Entre os principais metabólitos apontados pelo *VIP score*, as células pré-tratadas com DHA obtiveram uma redução da abundância de Inositol (Myo-Inositol 73\_4742), sendo este importante metabólito associado a sinalização celular e, muitas vezes, possui ação na neuroinflamação (Figura 21D). Além disso, foi observado um aumento da abundância de ácido láctico (147\_311) e fosfato (299\_1391) em células pré-tratadas com DHA. Também avaliamos se o perfil metabólico do pré-tratamento com DHA poderia ser influenciado pela infecção do ZIKV, comparando as condições DHA e DHA+ZIKV (Figura 21E). Dentre a identificação dos metabólitos do *VIP score* disponível até o momento, apenas a glicose (319\_4091) foi confirmada, apresentando maior abundância relativa em células infectadas (Figura 22D).



**Figura 20: Teste ANOVA com os metabólitos obtidos pela GC-MS.** Células C20 foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV MOI 10. Após 48h de estímulo e infecção, foram submetidas à GC-MS, com posterior análise pela plataforma MetaboAnalyst. Para análise multi-grupo, os metabólitos diferencialmente modulados foram determinados utilizando teste ANOVA, com limiar (*threshold*) de  $p < 0.05$ . Os círculos com a cor roxa determinam os metabólitos que obtiveram significância, considerando o limiar determinado. Os valores de  $p$  foram transformados por  $-\log_{10}$ , de modo que os metabólitos mais significativos (com menor valor de  $p$ ), foram plotados em uma posição mais alta no gráfico.



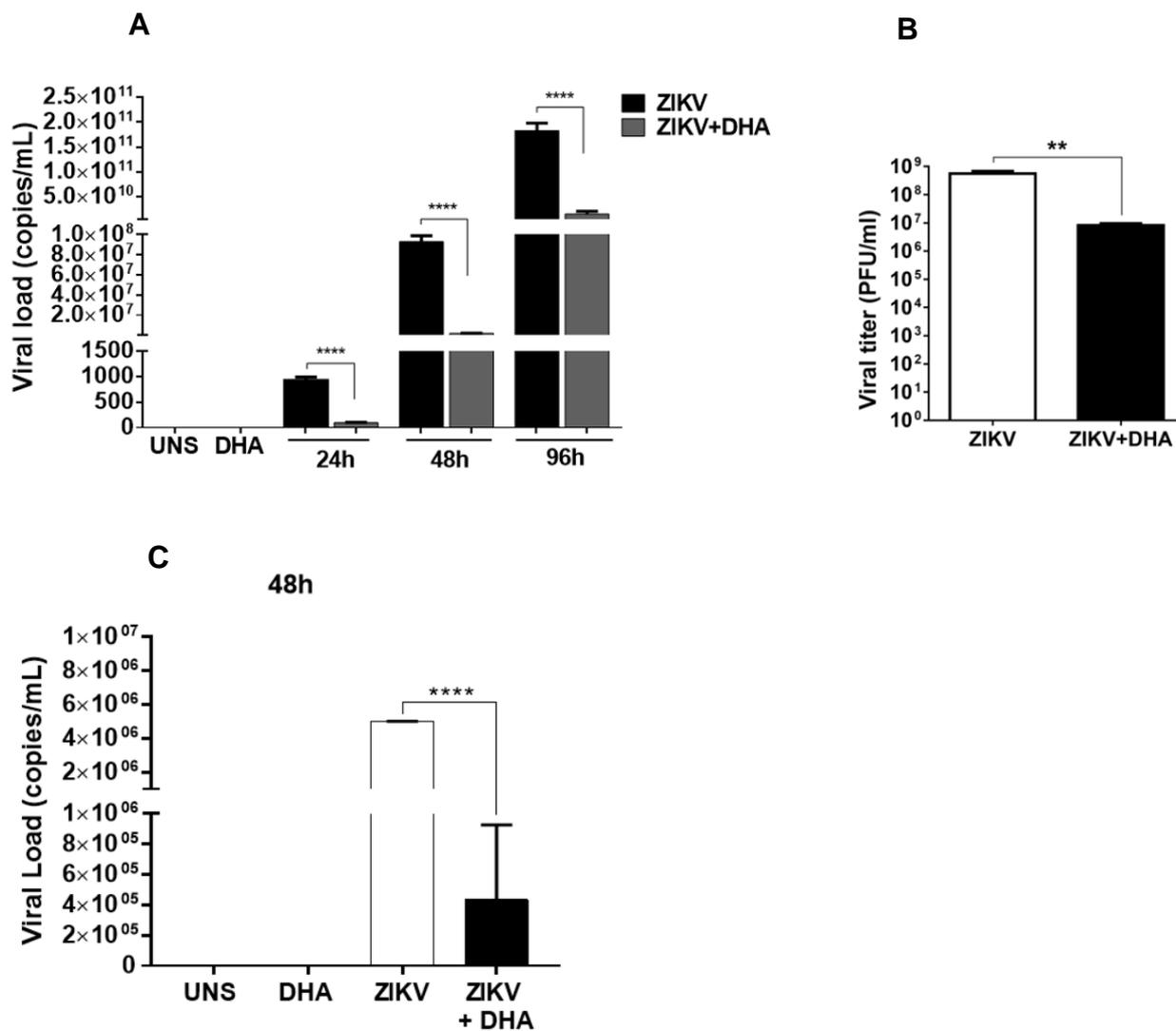
**Figura 21: Perfil metabólico de células microgliais infectadas com ZIKV e tratadas com DHA. Células C20 foram pré-tratadas (ou não)**

com DHA (12,5 $\mu$ M) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV MOI 10. Após 48h de estímulo e infecção, foram submetidas à GC-MS, com posterior análise pela plataforma MetaboAnalyst, pela qual foi plotado o *score* OPLS-DA (**a**) e o *VIP score* comparando células UNS e ZIKV (**b**); ZIKV e ZIKV+DHA (**c**), DHA e UNS (**d**); DHA e ZIKV+DHA (**e**).

### 5.13. O DHA reduz a carga viral do ZIKV em células neuronais e microgliais

Para analisar se as modulações feitas pelo DHA durante a infecção do ZIKV seriam capazes de prejudicar o processo de replicação viral, avaliamos a carga viral nas células neuronais após 24, 48 e 96h de infecção e estímulos, por RT-qPCR (Figura 22A). Observamos que o ZIKV infecta e se replica de forma eficaz nestas células, considerando o aumento significativo de sua carga viral ao longo do tempo de infecção, chegando a  $10^{11}$  cópias virais/ml no tempo de 96h. Surpreendentemente, quando as células são pré-tratadas com anteriormente à infecção, observamos uma redução da carga viral desde o tempo inicial de 24h, demonstrando que, de fato, as modulações feitas pelo DHA são capazes de impactar o ciclo viral. Além disso, avaliamos também se haveria impacto também sob o título viral, contabilizado através do efeito citopático às células as quais infecta, acessado por PFU (Figura 22B). Observamos que o DHA também possui um papel protetor, reduzindo o título viral e, conseqüentemente, protegendo contra o efeito citopático do vírus, como constatado em resultados anteriores.

Para avaliar se o mesmo efeito seria observado na micróglia, verificamos a carga viral por RT-qPCR após 48h de infecção e estímulo (Figura 22C). Observamos que o ZIKV infecta eficientemente a micróglia C20, dado ainda não disponível na literatura para essa linhagem. Mesmo que as modulações causadas pelo DHA tenham sido, parcialmente, distintas entre a linhagem neuronal e a de micróglia, observamos redução da carga viral com o pré-tratamento também na célula microglial. Esse resultado demonstra a importância do tratamento com DHA contra essa arbovirose e sugere que este lipídeo possa, de fato, causar uma interrupção ao ciclo viral em diferentes tipos celulares.



**Figura 22: Análise de carga viral nas células neuronais e microgliais.** Células SH-SY5Y foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5µM) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV (MOI 10). Após 24, 48 e 72h de infecção, a carga viral foi analisada por RT-qPCR (**a**) e o título viral determinado por PFU (**b**). Células C20 foram pré-tratadas (ou não) com DHA (12,5µM) e posteriormente infectadas (ou não) com ZIKV MOI 10. Após 48 de estímulo e infecção, a carga viral foi analisada por RT-qPCR (**c**). Os gráficos foram gerados usando GraphPad Prism 6.3. Os valores significativos de P foram representados por asteriscos:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) e  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).

## 6. Discussão

A epidemia do ZIKV ocasionou um aumento substancial de agravos neurológicos pós-infecção, como a Síndrome de Guillain-Barré e a Síndrome da Zika Congênita (1). O grande tropismo que o vírus apresenta por células do SNC e os distúrbios neurais causados pela infecção, alertou a comunidade científica acerca da urgência de terapias eficazes e desenvolvimento de vacinas contra essa arbovirose. Apesar dos estudos crescentes explorando a aplicação do DHA, um ácido-graxo poli-insaturado de ômega-3 (PUFA), contra doenças neurodegenerativas (68,86,96,98), a ação deste contra infecções que afetam o SNC ainda é pouco conhecida. Considerando o potencial neuroprotetor do DHA e os efeitos deletérios do ZIKV em células neurais, se torna de grande interesse investigar como a infecção desta arbovirose poderia ser afetada pelo tratamento com DHA, visando aplicações terapêuticas dessa biomolécula de ômega-3.

Na busca por modelos que pudessem representar neurônios humanos para avaliar a patogênese do ZIKV, a linhagem de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) foi utilizada em alguns trabalhos, especialmente devido a sua extensa aplicação em estudos com a doença de Parkinson e outros modelos dentro da neurociência (48,104–106). É uma célula que apresenta propriedades bioquímicas e funcionais de um “neurônio imaturo”, sendo comumente chamada de célula *neuronal-like* ou *neuroblast-like*. Um dos estudos publicados utilizando a linhagem SH-SY5Y avaliando a patogênese do ZIKV demonstrou que o vírus é capaz de causar um efeito citopático a partir de 72h de infecção (107), considerado um tempo tardio, sendo este o mesmo evento observado quando analisamos a viabilidade celular por MTT. Esse resultado alertou acerca de importantes modulações causadas pelo ZIKV em tempos iniciais que poderiam anteceder a morte celular, as quais serão discutidas mais à frente. Além da análise de viabilidade, observamos uma indução especificamente de morte celular apoptótica durante a infecção. Esse evento já foi reportado por alguns trabalhos utilizando células progenitoras neurais, nas quais observou-se a ativação de importantes fatores associados a esta via de morte, como a ativação da Caspase-3 e fosforilação de P53 (38,39,108,109). Neste contexto, avaliamos a eficácia do pré-tratamento com DHA contra os parâmetros de morte induzidos pelo vírus. A biomolécula lipídica apresentou uma ação anti-apoptótica e, conseqüentemente, protetora contra a infecção do ZIKV. Em outros

modelos neurais e diferentes perguntas experimentais, o DHA, e moléculas derivadas deste, foram previamente reportadas como indutoras de Bcl-2, uma importante proteína anti-apoptótica, bem como apresentaram ação inibitória da ativação de Caspase-3 (84,110,111).

Uma das vantagens em se aplicar o modelo de neuroblastoma como célula *neuronal-like*, é o seu ciclo celular ativo e alta capacidade proliferativa, a qual possibilita um longo tempo de cultivo *in vitro* (106). Contudo, esse efeito leva a problemática acerca da modulação da viabilidade celular induzida pelo ZIKV, uma vez a redução poderia estar associada tanto a uma interrupção do ciclo celular, quanto pela indução do próprio processo de morte. Foi demonstrado na literatura, usando células progenitoras neurais, que o ZIKV atenuou a proliferação, bem como induziu um impacto negativo à progressão do ciclo celular, com formação anormal do fuso mitótico (38,112,113). Verificando se o mesmo efeito ocorreria com a célula *neuronal-like*, observamos que a infecção não teve ação sob a proliferação celular, assim como não impactou negativamente a população de células na fase G2/M, a qual a célula se prepara para o processo de mitose. Com isso, a modulação da viabilidade celular observada anteriormente se dá, majoritariamente, pela ativação das vias de morte e não pela desregulação do ciclo celular. Por sua vez, o DHA levou ao aumento da proliferação e porcentagem de células na fase preparatória para mitose, independentemente da infecção com ZIKV. De fato, os  $\omega$ -PUFAs, especialmente o DHA, têm sido reportados na literatura como importantes agentes promotores da proliferação neuronal (88,114,115). A linhagem SH-SY5Y apresenta características em comum com neuroblastos e, dessa forma, expressa fatores de transcrição importantes para o processo de proliferação e diferenciação neural, tais como os fatores bHLH (*Basic Helix-Loop-Helix*) (116). Foi demonstrado que estes últimos podem ser modulados pela suplementação com DHA, sendo um processo fundamental para a função que este lipídeo exerce no processo de desenvolvimento do SNC (115,117,118).

Para entender melhor as modulações causadas pela infecção do ZIKV que antecedem a morte celular observada em 96h pós-infecção, avaliamos como o vírus impacta a função da mitocôndria, organela central para a homeostase

metabólica. Alguns estudos reportaram que a infecção é capaz de causar falha na atividade mitocondrial em células progenitoras (38) e também de astrócitos (40). No modelo de células *neuronal-like*, observamos que o vírus reduz a respiração basal e consumo de oxigênio acoplado à síntese de ATP, sendo forte indicativo de respiração desacoplada e dano à função mitocondrial. Para suprir a alta demanda metabólica e manter a alta taxa de proliferação celular, estudos demonstraram que a linhagem de neuroblastoma podem aumentar tanto a glicólise, como a fosforilação oxidativa (OXPHOS) para a produção de ATP (119,120). Com isso, a indução de disfunção mitocondrial causada pela infecção pode prejudicar a demanda metabólica, tornando essas células vulneráveis ao estresse oxidativo celular e apoptose, modulações que de fato foram demonstradas quando infectamos as células com ZIKV. Por sua vez, o DHA foi eficaz em prevenir contra a disfunção mitocondrial e da produção aumentada de espécies reativas (RS) induzidas pelo ZIKV, levando à maior resistência das células pré-tratadas contra a massiva morte celular causada pela infecção. Curiosamente, quando usamos o DHA na ausência da infecção pelo ZIKV, observamos um aumento de RS. Buscando na literatura, um estudo utilizando a linhagem de neuroblastoma SK-N-BE, comumente usada como modelo de célula neural em estudos com a doença de Alzheimer, demonstrou que o DHA foi capaz de atenuar ou amplificar a produção de RS, a depender da concentração usada do lipídeo (121). De fato, em doses mais altas (50 $\mu$ M), o DHA é capaz de estimular estresse oxidativo e peroxidação lipídica de células tumorais, incluindo neuroblastoma (121,122). Contudo, na concentração de DHA utilizada neste trabalho, os seus efeitos neuroprotetores foram significativamente mais evidentes do que sua ação antitumoral, demonstrando ser um tratamento promissor contra os efeitos deletérios do ZIKV.

A modulação do perfil inflamatório é um importante contribuinte para o dano neural associado à infecção do ZIKV. A inflamação proveniente do neurônio possui um papel importante, especialmente através da produção de fatores neurotóxicos que promovem morte celular associada a infecção do ZIKV (50). Nós observamos um aumento de fatores pró-inflamatórios, como a citocina IL-6 e a quimiocina MCP-1, quando o ZIKV infecta as células neuronais. Estas foram atenuadas pelo tratamento com DHA, concomitante ao aumento de TGF- $\beta$ ,

importante citocina anti-inflamatória. É importante ressaltar que o DHA atenuou a resposta pró-inflamatória, sem a inibir por completo, mantendo um equilíbrio essencial para impedir o dano celular, mas conseguir combater a infecção ao mesmo tempo (123,124). Também avaliamos a produção do mediador lipídico LTB<sub>4</sub>, uma molécula altamente pró-inflamatória, a qual pode ter sua concentração alterada quando há maior disponibilidade de DHA na célula (94). Contudo, não observamos modulações da biossíntese deste mediador em 96h de infecção. Também avaliamos a produção de óxido nítrico (NO), uma importante molécula sinalizadora que possui tanto um papel fundamental para o funcionamento do SNC, quanto no estabelecimento de desordens neurológicas, quando sua produção é exacerbada (125). Apesar disso, não observamos alterações da produção de NO por nenhum dos estímulos nas células neuronais.

Apesar do papel importante da inflamação proveniente do próprio neurônio, a linha de frente de resposta contra patógenos no SNC é a micróglia (126), a qual inicia o processo de neuroinflamação a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a danos celulares ou a patógenos (DAMPs e PAMPs, respectivamente) (127). Uma vez ativada, a micróglia passa por processos de proliferação e alterações metabólicas, sendo estes parâmetros importantes para avaliar a responsividade dessa célula frente a diferentes estímulos, como, por exemplo, em infecções por patógenos (51,128). Neste trabalho utilizamos a linhagem microglial C20, que em sua caracterização apresentou similaridades morfológicas de células primárias, bem como marcadores solúveis e de membrana que são fundamentais para a função da célula imune (99,129,130). Na ausência de estudos utilizando essa linhagem quanto a patogênese do ZIKV, demonstramos pela primeira vez que essa célula é responsiva ao vírus, com aumento de proliferação e da viabilidade mitocondrial quando infectadas. Diferentemente do que foi observado com as células neuronais, o DHA foi capaz de prevenir contra o aumento de viabilidade mitocondrial e celular, além de atenuar o processo de proliferação induzidos pelo ZIKV, sugerindo uma importante ação protetiva contra ativação da micróglia.

Para entender melhor acerca do processo de ativação microglial, iniciamos uma análise de parâmetros gerais associados a este processo, como a biogênese de

corpúsculos lipídicos (CLs). As alterações metabólicas que acompanham a ativação microglial culminam na maior biogênese de CLs, caracterizando o acúmulo destes como *hallmark* da hiper-reatividade microglial (51,131,132). Considerando a importância dessa organela para a ativação da micróglia, observamos que o ZIKV aumenta a biogênese de CLs, corroborando com dados publicados em células placentárias (18). É importante enfatizar que CLs vêm sendo apontados como essenciais para a replicação de diferentes vírus, servindo como plataforma de montagem da partícula viral e provendo importantes componentes que favorecem o ciclo viral (133–136). O DHA, por sua vez, atenuou a biogênese de CLs comparado às células infectadas sem o tratamento, podendo ter impacto tanto na ativação microglial, quanto acerca da replicação viral, considerando os pontos discutidos previamente.

Para avaliar a resposta imune proveniente da micróglia, se torna crucial identificar citocinas e quimiocinas produzidas por essa célula imune, a fim de determinar se o perfil polarização induzido pelo estímulo se caracteriza como M1 (pró-inflamatório) ou M2 (anti-inflamatório). Citocinas e quimiocinas clássicas, consideradas marcadores de um perfil M1, foram avaliadas neste contexto, sendo essas IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 (137,138). Corroborando com estudos previamente publicados (45,128), a infecção do ZIKV aumentou a produção destas citocinas pela micróglia, sugerindo uma polarização M1 em resposta à infecção por esse vírus. Em contrapartida, o DHA mitigou a produção destes marcadores pró-inflamatórios, além de estimular a citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$ , a qual é comumente produzida por células com perfil M2 (137). Esses resultados fortalecem a importante ação anti-inflamatória do DHA, o qual foi capaz de modular a principal célula que guia o processo inflamatório do SNC.

Além da produção de citocinas, a micróglia apresenta uma função central na ponte entre a resposta imune inata e adaptativa, agindo como célula apresentadora de antígenos (APCs) peptídicos e lipídicos, guiando a resposta proveniente de linfócitos T infiltrantes no SNC (55,57,139,140). Contudo, a função de APC da micróglia ainda é pouco explorada na literatura, especialmente acerca de infecções que afetam o SNC. Visando elucidar os mecanismos de ativação microglial induzidos pelo ZIKV, bem como contribuir para a literatura

escassa a respeito da apresentação de antígenos pela micróglia, investigamos a expressão de MHC-II e da proteína co-estimulatória CD80, sendo estas moléculas comumente aumentadas durante processos inflamatórios. Observamos que a infecção pelo ZIKV não modula essa via de apresentação de antígenos peptídicos; contudo, curiosamente, a infecção parece influenciar a forma com que o DHA age na expressão dessas moléculas, uma vez que verificamos o aumento de ambas apenas na condição tratada e não-infectada. Com base na literatura, estudos reportaram que infecções virais podem bloquear essa via de apresentação antigênica através da atenuação da sinalização de IFN- $\gamma$  (141). Quanto ao DHA, estudos o abordaram como potente modulador da composição lipídica da membrana celular, podendo alterar *rafts* ou domínios, de interação de lipídeos com proteínas de membrana (93). Foi demonstrado que essa modulação de *raft* lipídico é capaz de alterar a organização de moléculas de MHC na membrana e aumentar o reconhecimento destas por anticorpos específicos (142). Contudo, a modulação dessa via de apresentação antigênica pelo DHA ainda é controversa e não possui uma conclusão acerca do seu efeito (143,144).

A apresentação de antígenos lipídicos vem emergindo como uma importante via de combate à patógenos virais, através da expressão das moléculas da família CD1 (65). Essas moléculas são capazes de ativar um grupo restrito de linfócitos T, bem como células T  $\gamma\delta$  (64,145). Foi demonstrado que o vírus da hepatite B (HBV) pode levar ao aumento de um grupo seletivo de fosfolipases A2 (PLA2), que clivam cadeias lipídicas endógenas e as tornam imunogênicas (146). Essas moléculas são apresentadas via CD1 e ativam a respostas de células natural killers T (NKT), aumentando tanto a capacidade do organismo de eliminar o HBV como a especificidade da resposta imune via células B e T a longo prazo (64). O impacto da infecção pelo ZIKV sob esse tipo de apresentação antigênica ainda não foi reportado na literatura. Avaliando diferentes componentes dessa família, verificamos que o ZIKV não modulou a expressão das moléculas CD1; contudo, o pré-tratamento com DHA foi capaz de aumentar a expressão de CD1c na superfície da micróglia humana durante a infecção do ZIKV. Pouco se sabe a respeito da apresentação de antígenos lipídicos durante a suplementação com  $\omega$ -PUFAs, porém, a alteração do repertório lipídico induzido por essas biomoléculas poderia ser uma das explicações para a modulação dessa via de apresentação

antigênica (147). Como a infecção pelo ZIKV também possui impacto sob o metabolismo lipídico, a apresentação antigênica via CD1 induzida pelo DHA pode ser importante para aprimorar o combate a este vírus pela resposta imune.

Além de participar do processo de apresentação de antígenos, a micróglia também expressa importantes moléculas com funções regulatórias, que podem estimular ou atenuar a resposta imune. Explorar esses marcadores pode ser importante para entender como essa célula modula o microambiente inflamatório, além de prover informações acerca do seu perfil de ativação. Com isso, observamos que o pré-tratamento com DHA aumentou intensamente a expressão de DC-SIGN (CD2019), sendo este um receptor de lecitina expresso majoritariamente na membrana de APCs (148). Estudos demonstram que em células microgliais e em macrófagos, o aumento da expressão de DC-SIGN está associado a polarização de um perfil M2 (57,61). Esse resultado corrobora com os achados observados no perfil de citocinas, nos quais o DHA também modulou marcadores de um perfil anti-inflamatório da micróglia humana.

Em contrapartida, ao avaliarmos a expressão de PD-L1, observamos que a infecção pelo ZIKV induz uma alta expressão deste marcador, enquanto o DHA atenuou esse efeito. PD-L1 é um ligante do receptor inibitório PD-1, comumente expresso na membrana de linfócitos T (149,150). A interação do receptor com o seu ligante leva a um estado de baixa responsividade pelo linfócito, processo também conhecido por anergia, impedindo a ação efetora proveniente da célula T (151). Uma das respostas antivirais mais eficazes são provenientes de linfócitos T (152,153), ou seja, o efeito de aumentar a expressão de PD-L1 causado pelo ZIKV poderia ser um mecanismo associado a evasão do sistema imune (152). O ZIKV causa uma produção exacerbada dos fatores clássicos da resposta imune inata, mas, ao mesmo tempo, estimula uma resposta que pode ser inibitória de linfócitos T, levando a um desbalanço do processo inflamatório. Em contrapartida, apesar de o DHA modular um perfil M2 na micróglia, este lipídio não apresenta supressão total da resposta imune microglial, mantendo níveis cruciais para que essas células sejam capazes de eliminar o patógeno, sem causar dano celular. Esse conjunto de dados demonstram a importância do DHA como agente imunomodulador e restaurador da homeostase de células imunes.

Devido ao intenso processo de alteração metabólica que acompanha a ativação da micróglia (51,154), avaliamos como a função mitocondrial poderia ser modulada durante a infecção pelo ZIKV e tratamento com DHA. Diferente do que foi observado com as células neuronais, bem como reportado na literatura em astrócitos (40), o vírus não causou disfunção mitocondrial em 48h pós-infecção. Ao se ativar, a micróglia passa por processos de *shift*, ou alteração, metabólica que supre a elevada demanda energética e mantém a função mitocondrial em estágios iniciais (126,138). Contudo, a manutenção do estado de ativação celular a longo prazo leva ao acúmulo de ROS e intermediários que ativam vias inflamatórias, levando a perda de função da micróglia e expansão da inflamação no SNC (126,155). Neste processo, o estado disfuncional da micróglia leva a liberação de fatores neurotóxicos, como mitocôndrias fragmentadas, que podem ativar um processo inflamatório em outras células do SNC, como astrócitos (156). Contudo, no tempo analisado, observamos que mesmo ativando a célula microglial, o ZIKV não causou uma falha à fosforilação oxidativa e função da mitocôndria. O DHA, comparado apenas a infecção pelo ZIKV, atenuou a capacidade respiratória máxima e a capacidade de reserva, sendo esta última caracterizada como a capacidade de produção de ATP pela OXPHOS em caso de aumento repentino da demanda de energia (157,158). A redução desses parâmetros pode ser tanto indicativo de disfunção mitocondrial, como pode ser também indicativo de alteração da via oxidativa para outras vias metabólicas, como a via das pentose-fosfato (157). O *shift* metabólico para a via das pentoses-fosfato já foi demonstrado na literatura, sendo uma via importante para o processo de ativação da micróglia, pois esta possui como um dos seus principais produtos o carreador de elétrons NADPH (126,128,138). A produção de NADPH é fundamental para o controle do estresse oxidativo da micróglia, através do seu papel na manutenção da capacidade antioxidante da glutathione (159). Por sua vez, o DHA foi reportado como um importante agente antioxidante que pode reduzir a produção de ROS através do complexo da glutathione (160–162). Com isso, para explorar a hipótese de que o DHA poderia ter um impacto acerca dessas vias, avaliamos a produção de ROS e observamos que, de fato, o DHA reduziu significativamente essas espécies durante a infecção pelo ZIKV. Contudo, apesar de serem indicativos, análises específicas acerca do complexo REDOX da

glutaciona e da produção de NADPH precisam ser avaliadas para confirmar a hipótese.

Uma importante modulação que ocorre na micróglia durante o seu processo de ativação é o acúmulo de intermediários do ciclo do ácido cítrico, devido ao funcionamento anormal desta via em decorrência da atividade aumentada da via glicolítica (51). Neste contexto, nós observamos que a infecção pelo ZIKV foi capaz de aumentar a abundância de citrato, succinato, fumarato e malato, sendo estes importantes intermediários do ciclo do ácido cítrico, corroborando com os dados previamente discutidos acerca do aumento da ativação microglial causado pela infecção. O DHA atenuou a abundância de fumarato e malato, dois desses intermediários, demonstrando uma ação regulatória do ciclo do ácido cítrico. Como acúmulo desses intermediários é associado ao perfil de ativação da micróglia, o fato de o DHA modular de forma diferencial em relação a infecção do ZIKV (sem o pré-tratamento) demonstra uma modulação metabólica distinta entre essas condições, influenciando também em formas distintas da ativação microglial. O papel de  $\omega$ -PUFAs no ciclo do ácido cítrico ainda é pouco elucidado, contudo, em células hepáticas, a suplementação demonstrou um aumento da enzima malato desidrogenase, a qual catalisa a oxidação de malato em oxaloacetato (163). Essa modulação pode ser determinante para os níveis de malato, pois a reação leva ao consumo deste intermediário, e consequentemente, poderia reduzir sua abundância na célula.

Para verificar se a infecção pelo ZIKV e o tratamento com DHA poderiam ter influência no perfil metabólico global da micróglia, utilizamos a análise de GC-MS para identificar essas modulações e entender melhor sobre as alterações metabólicas observadas nessa célula imune. Observamos que as células apresentam um perfil metabólico distinto tanto durante a infecção, quanto pelo tratamento com DHA. Uma análise preliminar dos principais metabólitos envolvidos no processo foi executada e observamos uma importante modulação da glicose, aumentada durante a infecção pelo ZIKV e com níveis ainda mais abundantes quando as células foram pré-tratadas com DHA, com posterior infecção. Como reportado na literatura, um *shift* metabólico comumente observado na micróglia, seja por ativação ou outras demandas celulares, é a

alteração da OXPHOS para uma hiperativação da glicólise e, mesmo na presença de oxigênio, aumento do fluxo de fermentação da glicose a lactato, aumentando a atividade da enzima lactato desidrogenase (126,164). Esse fenômeno já foi descrito em diferentes células tumorais, sendo denominado Efeito Warburg (165,166). Mesmo não sendo a forma mais eficiente de síntese de ATP, é uma forma rápida de obtenção deste último, além de possibilitar o desvio para diferentes vias anabólicas importantes para as novas demandas metabólicas da célula microglial. Quando há esse *shift* metabólico na micróglia, é comumente observado um aumento do *uptake* de glicose, através da expressão aumentada de transportadores GLUT, em resposta a alta demanda energética. Além disso, o efeito Warburg é também associado ao desvio para a via das pentoses-fosfato, pela qual precursores fundamentais para a proliferação, como nucleotídeos e proteínas, podem ser disponibilizados para suportar a alta taxa de proliferação, bem como para produzir NADPH e manter o controle REDOX das células (51,126,164). Neste trabalho, a maior abundância de glicose encontrada em células tratadas com DHA, bem como aumento da abundância de ácido láctico são fortes indicativos que, de fato, esse  $\omega$ -PUFA aumenta o efeito Warburg de células microgliais, o que poderia favorecer a via das pentose-fosfato e manutenção da atividade antioxidante da micróglia, protegendo contra danos associados ao processo de ativação celular.

Dentre a identificação dos metabólitos, também observamos uma maior abundância de ácido palmítico em células infectadas pelo ZIKV na ausência de DHA em comparação às células infectadas com o pré-tratamento. O ácido palmítico, e produtos derivados do seu metabolismo, são capazes de estimular vias pró-inflamatórias e modular o estresse oxidativo celular em macrófagos (167,168). A menor abundância do ácido palmítico no pré-tratamento com DHA demonstra os diferentes mecanismos pelos quais o DHA age atenuando o perfil inflamatório e estresse oxidativo da micróglia durante a infecção pelo ZIKV.

Por fim, para avaliar se as alterações metabólicas e inflamatórias causadas pelo DHA durante a infecção pelo ZIKV poderia interferir na replicação viral, avaliamos a carga viral de células neuronais e microgliais. Verificamos que houve redução de carga viral nas duas linhagens celulares pelo pré-tratamento com DHA.

Uma crescente relação entre as alterações metabólicas e infecções virais vem sendo exploradas na literatura, demonstrando que a reprogramação metabólica causadas por diferentes vírus pode favorecer a sua replicação viral (18,133,136). Como demonstrado neste trabalho, o DHA também possui uma ação direta ao metabolismo celular, alterando a função mitocondrial em células neuronais, e agindo no metabolismo global de células microgliais. Essas modulações poderiam influenciar na disponibilidade de fatores para a replicação do ZIKV e, dessa forma, influenciar negativamente a sua replicação. A redução de carga viral observada em duas linhagens onde o DHA modulou, em alguns parâmetros, de forma distinta, demonstra o potencial antiviral desta molécula em diferentes modelos e fortalece a sua aplicação contra especialmente infecções que afetam o SNC.

## **7. Conclusões**

Considerando todos os resultados do presente trabalho em conjunto, concluímos que:

- O pré-tratamento com o ômega-3 DHA possui efeito protetor contra a morte e impacto negativo à viabilidade causados pela infecção do ZIKV em células neuronais, bem como promove a proliferação destas;
- O ZIKV é capaz de causar disfunção mitocondrial e estresse oxidativo em células neuronais e o ômega-3 DHA apresentou um importante papel protetor contra essas modulações;
- O ZIKV induz uma resposta pró-inflamatória proveniente de células neuronais e microgliais, a qual foi mitigada pelo ômega-3 DHA;
- A infecção do ZIKV aumenta a biogênese de corpúsculos lipídicos e o ômega-3 DHA é capaz de atenuar este processo;
- O ômega-3 DHA possui um papel imunomodulador fundamental para a micróglia durante a infecção com ZIKV, atenuando a inflamação exacerbada, mas estimulando apresentação de antígenos lipídicos e reduzindo moléculas supressoras da resposta de linfócitos T;

- Concomitante à ativação celular, a infecção do ZIKV causa uma reprogramação metabólica na micróglia, levando ao acúmulo de intermediários do ciclo do ácido cítrico, glicose e ácido palmítico;
- O ômega-3 DHA regula a função mitocondrial, reduz estresse oxidativo e modula intermediários do ciclo do ácido cítrico, alterando a disponibilidade de malato e fumarato;
- O ômega-3 DHA aumenta os níveis de glicose e ácido láctico, sugerindo um favorecimento do efeito Warburg em células microgliais;
- As alterações metabólicas e inflamatórias causadas pelo ômega-3 DHA são capazes de promover uma ação antiviral, levando a redução da carga viral de ZIKV em células neuronais e microgliais.

## 8. Bibliografia

1. Gubler DJ, Vasilakis N, Musso D. History and Emergence of Zika Virus. *J Infect Dis* (2017) **216**:S860–S867. doi:10.1093/infdis/jix451
2. World Health Organization (WHO). The History of Zika. *World Heal Organ* (2017)1–5. Available at: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/history/en/>
3. Musso D, Ko AI, Baud D. Zika Virus Infection — After the Pandemic. *N Engl J Med* (2019) **381**:1444–1457. doi:10.1056/nejmra1808246
4. Ayllón T, Campos R de M, Brasil P, Morone FC, Câmara DCP, Meira GLS, Tannich E, Yamamoto KA, Carvalho MS, Pedro RS, et al. Early evidence for zika virus circulation among aedes aegypti mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* (2017) **23**:1411–1412. doi:10.3201/eid2308.162007
5. Dénes A, Ibrahim MA, Oluoch L, Tekeli M, Tekeli T. Impact of weather seasonality and sexual transmission on the spread of Zika fever. *Sci Rep* (2019) **9**:1–10. doi:10.1038/s41598-019-53062-z

6. Almeida R das N, Braz-de-Melo HA, Santos I de O, Corrêa R, Kobinger GP, Magalhaes KG. The Cellular Impact of the ZIKA Virus on Male Reproductive Tract Immunology and Physiology. *Cells* (2020) **9**:1–17.  
doi:10.3390/cells9041006
7. Murray KO, Gorchakov R, Carlson AR, Berry R, Lai L, Natrajan M, Garcia MN, Correa A, Patel SM, Aagaard K, et al. Prolonged detection of zika virus in vaginal secretions and whole blood. *Emerg Infect Dis* (2017) **23**:99–101.  
doi:10.3201/eid2301.161394
8. Hasan SS, Sevvana M, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol* (2018) **25**:13–20.  
doi:10.1038/s41594-017-0010-8
9. Sirohi D, Kuhn RJ. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J Infect Dis* (2017) **216**:S935–S944. doi:10.1093/infdis/jix515
10. Strange DP, Jiyarom B, Zarandi NP, Xie X, Baker C, Sadri-Ardekani H, Shi P-Y, Verma S. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral. *Am Soc Microbiol* (2019) **10**:1–16.
11. Amara A, Mercer J. Viral apoptotic mimicry. *Nat Rev Microbiol* (2015) **13**:461–469. doi:10.1038/nrmicro3469
12. Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, Lampe M, Haselmann U, Funaya C, Schieber N, Ronchi P, et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep* (2017) **18**:2113–2123. doi:10.1016/j.celrep.2017.02.014
13. Strange DP, Jiyarom B, Pourhabibi Zarandi N, Xie X, Baker C, Sadri-Ardekani H, Shi P-Y, Verma S. Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. *MBio* (2019) **10**:1–16.  
doi:10.1128/mBio.01372-19
14. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, Le Charpentier T, Hafirassou ML, Zamborlini A, Cao-Lormeau VM, et al. Axl

- Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep* (2017) **18**:324–333. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.045
15. Nowakowski TJ, Pollen AA, Lullo E Di, Kriegstein AR, Francisco S, Francisco S, Francisco S, Francisco S. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Human Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* (2017) **18**:591–596. doi:10.1016/j.stem.2016.03.012.Expression
  16. Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM. The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. *J Virol* (2010) **84**:10438–10447. doi:10.1128/jvi.00986-10
  17. Den Boon JA, Diaz A, Ahlquist P. Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe* (2010) **8**:77–85. doi:10.1016/j.chom.2010.06.010
  18. 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) **11**: doi:10.1038/s41467-020-16754-z
  19. Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. Review An update on Zika virus infection. *Lancet* (2017) **390**:2099–2109. doi:10.1016/S0140-6736(17)31450-2
  20. Furtado JM, Espósito DL, Klein TM, Teixeira-Pinto T, da Fonseca BA. Uveitis Associated with Zika Virus Infection. *N Engl J Med* (2016) **375**:393–394. doi:10.1056/nejmc1513236
  21. Sarmiento-Ospina A, Vásquez-Serna H, Jimenez-Canizales CE, Villamil-Gómez WE, Rodriguez-Morales AJ. Zika virus associated deaths in Colombia. *Lancet Infect Dis* (2016) **16**:523–524. doi:10.1016/S1473-3099(16)30006-8
  22. Cardona-Ospina JA, Henao-SanMartin V, Acevedo-Mendoza WF, Nasner-Posso KM, Martínez-Pulgarín DF, Restrepo-López A, Valencia-Gallego V, Collins MH, Rodriguez-Morales AJ. Fatal Zika virus infection in the Americas: A systematic review. *Int J Infect Dis* (2019) **88**:49–59.

doi:10.1016/j.ijid.2019.08.033

23. dos Santos T, Rodriguez A, Almiron M, Sanhueza A, Ramon P, de Oliveira WK, Coelho GE, Badaró R, Cortez J, Ospina M, et al. Zika Virus and the Guillain – Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. *N Engl J Med* (2016)23–26.
24. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, Dub T, Baudouin L, Teissier A, Larre P, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* (2016) **387**:1531–1539. doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6
25. Garcez PP, Minardi Nascimento J, Mota de Vasconcelos J, Madeiro da Costa R, Delvecchio R, Trindade P, Correia Loiola E, Higa LM, Cassoli JS, Vitória G, et al. Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. *Nat Publ Gr* (2016)1–10. doi:10.1038/srep40780
26. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, Shi PY, Vasilakis N. *Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control*. Elsevier Ltd (2016). doi:10.1016/j.antiviral.2016.03.010
27. Leonhard SE, Bresani-Salvi CC, Lyra Batista JD, Cunha S, Jacobs BC, Ferreira MLB, Militão de Albuquerque M de FP. Guillain-barré syndrome related to zika virus infection: A systematic review and meta-analysis of the clinical and electrophysiological phenotype. *PLoS Negl Trop Dis* (2020) **14**:1–24. doi:10.1371/journal.pntd.0008264
28. CDC. Zika vírus: microcefalia e outros defeitos congênitos. *Centers Dis Control Prev* (2019)1–2. Available at: [https://portugues.cdc.gov/zika/healtheffects/birth\\_defects.html](https://portugues.cdc.gov/zika/healtheffects/birth_defects.html)
29. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, Araujo ESM, de Sequeira PC, de Mendonça MCL, de Oliveira L, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* (2016) **16**:653–660. doi:10.1016/S1473-3099(16)00095-5

30. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura C V., da Fonseca EB, Ribeiro EM, Ventura LO, Neto NN, Arena JF, et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital Zika syndrome for pediatric clinicians. *JAMA - J Am Med Assoc* (2017) **176**:139–148. doi:10.1001/jamapediatrics.2016.3982.Congenital
31. Chiu CF, Chu LW, Liao IC, Simanjuntak Y, Lin YL, Juan CC, Ping YH. The Mechanism of the Zika Virus Crossing the Placental Barrier and the Blood-Brain Barrier. *Front Microbiol* (2020) **11**:1–15. doi:10.3389/fmicb.2020.00214
32. Papa MP, Meuren LM, Coelho SVA, de Oliveira Lucas CG, Mustafá YM, Matassoli FL, Silveira PP, Frost PS, Pezzuto P, Ribeiro MR, et al. Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption. *Front Microbiol* (2017) **8**: doi:10.3389/fmicb.2017.02557
33. Adams Waldorf KM, Stencel-Baerenwald JE, Kapur RP, Studholme C, Boldenow E, Vornhagen J, Baldessari A, Dighe MK, Thiel J, Merillat S, et al. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. *Nat Med* (2016) **22**:1256–1259. doi:10.1038/nm.4193
34. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, Yao B, Shin J, Zhang F, Lee EM, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell* (2016) **18**:587–590. doi:10.1016/j.stem.2016.02.016
35. Zhang N, Zhang N, Qin CF, Liu X, Shi L, Xu Z. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* (2016) **19**:120–126. doi:10.1016/j.stem.2016.04.017
36. Garcez PP, Loiola EC, Da Costa RM, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, Nascimento JM, Brindeiro R, Tanuri A, Rehen SK. Zika virus: Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science (80- )* (2016) **352**:816–818. doi:10.1126/science.aaf6116
37. Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo SS, Lee SA, Ge J, Wang S, Goldman SA, Zlokovic B V., et al. 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) **19**:663–671.  
doi:10.1016/j.stem.2016.07.019
38. Onorati M, Li Z, Liu F, Sousa AMM, Nakagawa N, Li M, Dell’Anno MT, Gulden FO, Pochareddy S, Tebbenkamp ATN, et al. Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. *Cell Rep* (2016) **16**:2576–2592.  
doi:10.1016/j.celrep.2016.08.038
  39. Rothan HA, Fang S, Mahesh M, Byrareddy SN. Zika Virus and the Metabolism of Neuronal Cells. *Mol Neurobiol* (2018) **2018**: doi:10.1007/s12035-018-1263-x
  40. Ledur PF, Karmirian K, Pedrosa C da SG, Souza LRQ, Assis-de-Lemos G, Martins TM, Ferreira J de CCG, de Azevedo Reis GF, Silva ES, Silva D, et al. Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. *Sci Rep* (2020) **10**:1–14.  
doi:10.1038/s41598-020-57914-x
  41. Robinson LR, Bitsko RH, Thompson RA, Dworkin PH, McCabe MA, Peacock G, Thorpe PG. CDC Grand Rounds: Addressing Health Disparities in Early Childhood. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2017) **66**:769–772.  
doi:10.15585/mmwr.mm6629a1
  42. Mavigner M, Raper J, Kovacs-balint Z, Gumber S, Neal JTO, Bhaumik SK, Zhang X, Habib J, Mattingly C, Mcdonald CE, et al. Postnatal Zika virus infection is associated with persistent abnormalities in brain structure , function , and behavior in infant macaques. (2018) **6975**:1–16.
  43. Raper J, Kovacs-Balint Z, Mavigner M, Gumber S, Burke MW, Habib J, Mattingly C, Fair D, Earl E, Feczko E, et al. Long-term alterations in brain and behavior after postnatal Zika virus infection in infant macaques. *Nat Commun* (2020) **11**:1–12. doi:10.1038/s41467-020-16320-7
  44. Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava JA, Chai G, Sheets N, Tang W, Terskikh A V., Shresta S, Gleeson JG. Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell* (2016) **19**:593–598.

doi:10.1016/j.stem.2016.08.005

45. Figueiredo CP, Barros-Aragão FGQ, Neris RLS, Frost PS, Soares C, Souza INO, Zeidler JD, Zamberlan DC, de Sousa VL, Souza AS, et al. Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. *Nat Commun* (2019) **10**: doi:10.1038/s41467-019-11866-7
46. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol Biol* (2013) **1078**:35–44. doi:10.1007/978-1-62703-640-5
47. Luplertlop N, Suwanmanee S, Muangkaew W, Ampawong S. The impact of Zika virus infection on human neuroblastoma ( SH-SY5Y ) cell line. (2017)207–214.
48. Alpuche-Lazcano SP, McCulloch CR, Del Corpo O, Rance E, Scarborough RJ, Moulard AJ, Sagan SM, Teixeira MM, Gatignol A. Higher cytopathic effects of a zika virus brazilian isolate from bahia compared to a Canadian-imported thai strain. *Viruses* (2018) **10**: doi:10.3390/v10020053
49. Lawrence T, Gilroy DW. Chronic inflammation: A failure of resolution? *Int J Exp Pathol* (2007) **88**:85–94. doi:10.1111/j.1365-2613.2006.00507.x
50. Olmo IG, Carvalho TG, Costa V V, Alves-silva J. Zika Virus Promotes neuronal cell Death in a non-cell autonomous Manner by Triggering the release of neurotoxic Factors. (2017) **8**:1–14. doi:10.3389/fimmu.2017.01016
51. Chausse B, Kakimoto PA, Kann O. Microglia and lipids: how metabolism controls brain innate immunity. *Semin Cell Dev Biol* (2020) **112**:137–144. doi:10.1016/j.semcdb.2020.08.001
52. Lum FM, Low DKS, Fan Y, Tan JYL, Lee B, Chan JKY, Rénia L, Ginhoux F, Ng LFP. Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. *Clin Infect Dis* (2017) **64**:914–920. doi:10.1093/cid/ciw878
53. Lin S, Yang S, He J, Guest JD, Ma Z, Yang L, Pierce BG, Zhang Y-J. Zika virus NS5 protein antagonizes type I interferon production via blocking TBK1

- activation. *Virology* (2019) **176**:139–148. doi:10.1016/j.virol.2018.11.009.Zika
54. Cruz ALS, Barreto E de A, Fazolini NPB, Viola JPB, Bozza PT. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death Dis* (2020) **11**: doi:10.1038/s41419-020-2297-3
55. Schettters STT, Gomez-Nicola D, Garcia-Vallejo JJ, Van Kooyk Y. Neuroinflammation: Microglia and T cells get ready to tango. *Front Immunol* (2018) **8**: doi:10.3389/fimmu.2017.01905
56. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. *Pathways of antigen processing*. (2013). doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095910
57. Walker DG, Lue LF. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: Challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimer's Res Ther* (2015) **7**:1–9. doi:10.1186/s13195-015-0139-9
58. Dangond F, Windhagen A, Groves CJ, Hafler DA. Constitutive expression of costimulatory molecules by human microglia and its relevance to CNS autoimmunity. *J Neuroimmunol* (1997) **76**:132–138. doi:10.1016/S0165-5728(97)00043-X
59. Chen Q, Xu L, Du T, Hou Y, Fan W, Wu Q, Yan H. Enhanced Expression of PD-L1 on Microglia After Surgical Brain Injury Exerts Self-Protection from Inflammation and Promotes Neurological Repair. *Neurochem Res* (2019) **44**:2470–2481. doi:10.1007/s11064-019-02864-8
60. Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. DC-SIGN: The Strange Case of Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Immunity* (2015) **42**:983–985. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.021
61. Durafourt BA, Moore CS, Zammit DA, Johnson TA, Zaguia F, Guiot MC, Bar-Or A, Antel JP. Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia* (2012) **60**:717–727. doi:10.1002/glia.22298

62. Bricard G, Porcelli SA. Antigen presentation by CD1 molecules and the generation of lipid-specific T cell immunity. *Cell Mol Life Sci* (2007) **64**:1824–1840. doi:10.1007/s00018-007-7007-0
63. Luoma AM, Castro CD, Adams EJ.  $\gamma\delta$  T cell surveillance via CD1 molecules. *Trends Immunol* (2014) **35**:613–621. doi:10.1016/j.it.2014.09.003
64. Schönrich G, Raftery MJ. CD1-restricted t cells during persistent virus infections: “Sympathy for the devil.” *Front Immunol* (2018) **9**:1–16. doi:10.3389/fimmu.2018.00545
65. Dowds CM, Kornell S-C, Blumberg RS, Zeissig S. Lipid antigens in immunity. *Biol Chem* (2015) **395**:61–81. doi:10.1515/hsz-2013-0220.Lipid
66. Yaqoob P. Understanding Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Postgr Med* (2009) **121**:148–157.
67. Shahidi F, Ambigaipalan P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annu Rev Food Sci Technol* (2018) **9**:345–381. doi:10.1146/annurev-food-111317-095850
68. Calder PC. Very long-chain n-3 fatty acids and human health: Fact, fiction and the future. *Proc Nutr Soc* (2018) **77**:52–72. doi:10.1017/S0029665117003950
69. Bougnoux P. Omega – 6 / Omega – 3 Polyunsaturated. (2015)
70. Troesch B, Eggersdorfer M, Laviano A, Rolland Y, Smith AD, Warnke I, Weimann A, Calder PC. Expert opinion on benefits of long-chain omega-3 fatty acids (DHA and EPA) in aging and clinical nutrition. *Nutrients* (2020) **12**:1–25. doi:10.3390/nu12092555
71. Tevar R, Jho DH, Babcock T, Helton WS, Espat NJ.  $\omega$ -3 Fatty Acid Supplementation Reduces Tumor Growth and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in a Model of Progressive Non-Metastasizing Malignancy \*. (2002) **26**:285–289.
72. Parada B, Reis F, Cerejo R, Garrido P, Sereno J, Xavier-cunha M, Neto P, Mota

- A, Figueiredo A, Teixeira F. Omega-3 Fatty Acids Inhibit Tumor Growth in a Rat Model of Bladder Cancer. (2013) **2013**:
73. Pizato N, Luzete BC, Fernanda L, Vasconcelos M, Corrêa LH, Santos IDO, Antônio J, Assumpção F, Ito MK, Magalhães KG. Omega-3 docosahexaenoic acid induces pyroptosis cell death in triple-negative breast cancer cells. (2018)1–12. doi:10.1038/s41598-018-20422-0
  74. Anil E. The impact of EPA and DHA on blood lipids and lipoprotein metabolism: Influence of apoE genotype. *Proc Nutr Soc* (2007) **66**:60–68. doi:10.1017/S0029665107005307
  75. Dyall SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci* (2015) **7**:1–15. doi:10.3389/fnagi.2015.00052
  76. Holub BJ. Docosahexaenoic acid (DHA) and cardiovascular disease risk factors. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* (2009) **81**:199–204. doi:10.1016/j.plefa.2009.05.016
  77. Knobloch M. The Role of Lipid Metabolism for Neural Stem Cell Regulation. *Brain Plast* (2017) **3**:61–71. doi:10.3233/bpl-160035
  78. Weiser MJ, Butt CM, Mohajeri MH. Docosahexaenoic acid and cognition throughout the lifespan. *Nutrients* (2016) **8**:1–40. doi:10.3390/nu8020099
  79. Balayev L, Hong S-H, Menghani H, Macell SJ, Obenaus A, Freitas RS, Khoutorova L, Balaszczuk V, Jun B, Oriá RB, et al. Docosanoids Promote Neurogenesis and Angiogenesis, Blood- Brain Barrier Integrity, Penumbra Protection and Neurobehavioral Recovery after Experimental Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol* (2019) **176**:139–148. doi:10.1007/s12035-018-1136-3.Docosanoids
  80. Cao D, Kevala K, Kim J, Moon HS, Jun SB, Lovinger D, Kim HY. Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J Neurochem* (2009) **111**:510–521. doi:10.1111/j.1471-

4159.2009.06335.x

81. Kim H-Y. Neuroprotection by Docosahexaenoic Acid in Brain Injury. *Mil Med* (2014) **179**:106–111. doi:10.7205/MILMED-D-14-00162
82. Akbar M, Calderon F, Wen Z, Kim H-Y. Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci* (2005) **102**:10858–10863. doi:10.1073/pnas.0502903102
83. Descorbeth M, Figueroa K, Serrano-Illán M, De León M. Protective effect of docosahexaenoic acid on lipotoxicity-mediated cell death in Schwann cells: Implication of PI3K/AKT and mTORC2 pathways. *Brain Behav* (2018) **8**:1–12. doi:10.1002/brb3.1123
84. Ajami M, Eghtesadi S, Razaz JM, Kalantari N, Habibey R, Nilforoushzadeh MA, Zarrindast M, Pazoki-Toroudi H. Expression of Bcl-2 and Bax after hippocampal ischemia in DHA + EPA treated rats. *Neurol Sci* (2011) **32**:811–818. doi:10.1007/s10072-011-0621-5
85. Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, Kriem B, Koziel V, Escanyé MC, Fifre A, Sponne I, Leininger-Muller B, Olivier JL, et al. Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid- $\beta$  oligomers. *J Neurochem* (2006) **96**:385–395. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03541.x
86. Mayurasakorn K, Williams JJ, Ten VS, Deckelbaum RJ. Docosahexaenoic acid: brain accretion and roles in neuroprotection after brain hypoxia and ischemia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (2014) **14**:158–167. doi:10.1097/MCO.0b013e328342cba5.Docosahexaenoic
87. Jiao J, Li Q, Chu J, Zeng W, Yang M, Zhu S. Effect of n-3 PUFA supplementation on cognitive function throughout the life span from infancy to old age : a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials 1–4. *Am J Clin Nutr* (2014) **100**:1422–1436. doi:10.3945/ajcn.114.095315.1422
88. Lauritzen L, Brambilla P, Mazzocchi A, Harsløf LBS, Ciappolino V, Agostoni C. DHA effects in brain development and function. *Nutrients* (2016) **8**:1–17.

doi:10.3390/nu8010006

89. Carver JD, Benford VJ, Han B, Cantor AB. The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. *Brain Res Bull* (2001) **56**:79–85. doi:10.1016/S0361-9230(01)00551-2
90. Cetin I, Alvino G, Cardellicchio M. Long chain fatty acids and dietary fats in fetal nutrition. *J Physiol* (2009) **587**:3441–3451. doi:10.1113/jphysiol.2009.173062
91. Casares D, Escribá P V., Rosselló CA. Membrane lipid composition: Effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *Int J Mol Sci* (2019) **20**: doi:10.3390/ijms20092167
92. Sonnino S, Prinetti A. Membrane Domains and the “Lipid Raft” Concept. *Curr Med Chem* (2012) **20**:4–21. doi:10.2174/09298673130103
93. Wassall SR, Leng X, Canner SW, Pennington ER, Kinnun JJ, Cavazos AT, Dadoo S, Johnson D, Heberle FA, Katsaras J, et al. Docosahexaenoic acid regulates the formation of lipid rafts: A unified view from experiment and simulation. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* (2018) **1860**:1985–1993. doi:10.1016/j.bbamem.2018.04.016
94. Calder PC. Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes. (2010)355–374. doi:10.3390/nu2030355
95. Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, Hardy M, Gimenez JM, Chiang N, Serhan CN, et al. Novel Docosanoids Inhibit Brain Ischemia-Reperfusion-mediated Leukocyte Infiltration and Pro-inflammatory Gene Expression. *J Biol Chem* (2003) **278**:43807–43817. doi:10.1074/jbc.M305841200
96. Bazan NG. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol* (2005) **15**:159–166. doi:10.1111/j.1750-3639.2005.tb00513.x

97. Bazan NG, Calandria JM, Gordon WC. Docosahexaenoic acid and its derivative neuroprotectin d1 display neuroprotective properties in the retina, brain and central nervous system. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* (2013) **77**:121–131. doi:10.1159/000351395
98. Bazan NG. Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer’s disease. *J Lipid Res* (2009) **50**: doi:10.1194/jlr.R800068-JLR200
99. Garcia-Mesa Y, Jay TR, Checkley MA, Luttge B, Dobrowolski C, Valadkhan S, Landreth GE, Karn J, Alvarez-Carbonell D. Immortalization of primary microglia: a new platform to study HIV regulation in the central nervous system. *J Neurovirol* (2017) **23**:47–66. doi:10.1007/s13365-016-0499-3
100. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb Protoc* (2016) **2016**:343–346. doi:10.1101/pdb.prot087379
101. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* (2008) **14**:1232–1239. doi:10.3201/eid1408.080287
102. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* (1938) **27**:493–497. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
103. ATCC. Converting TCID<sub>50</sub> to plaque forming units (PFU). (2016) **2407**:17025. Available at: [https://www.atcc.org/en/Global/FAQs/4/8/Converting\\_TCID50\\_to\\_plaque\\_forming\\_units\\_PFU-124.aspx](https://www.atcc.org/en/Global/FAQs/4/8/Converting_TCID50_to_plaque_forming_units_PFU-124.aspx)
104. Sánchez-San Martín C, Li T, Bouquet J, Streithorst J, Yu G, Paranjpe A, Chiu CY. Differentiation enhances Zika virus infection of neuronal brain cells. *Sci Rep* (2018) **8**:1–10. doi:10.1038/s41598-018-32400-7
105. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson’s

- disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener* (2017) **12**:1–11.  
doi:10.1186/s13024-017-0149-0
106. Hong-rong X, Lin-sen H, Guo-yi L. SH. SY5Y human neuroblastoma cell line : in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's diseases. *Chinese Med J* (2010)1086–1092. doi: : 10. 3760/cma. j. issn. 0366. 6999. 2010 . 08. O2
  107. Luplertlop N, Suwanmanee S, Muangkaew W, Ampawong S, Kitisin T, Poovorawan Y. The impact of zika virus infection on human neuroblastoma (Sh-SY5Y) cell line. *J Vector Borne Dis* (2017) **54**:207–214. doi:10.4103/0972-9062.217611
  108. El Ghouzzi V, Bianchi FT, Molineris I, Mounce BC, Berto GE, Rak M, Lebon S, Aubry L, Tocco C, Gai M, et al. ZIKA virus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations involved in severe forms of genetic microcephaly and p53. *Cell Death Dis* (2016) **7**:  
doi:10.1038/cddis.2016.266
  109. Alzhanova D, Corcoran K, Bailey AG, Long K, Taft-Benz S, Graham RL, Broussard GS, Heise M, Neumann G, Halfmann P, et al. Novel modulators of p53-signaling encoded by unknown genes of emerging viruses. *PLoS Pathog* (2021) **17**:1–28. doi:10.1371/journal.ppat.1009033
  110. Sinha RA, Khare P, Rai A, Maurya SK, Pathak A, Mohan V, Nagar GK, Mudiam MKR, Godbole MM, Bandyopadhyay S. Anti-apoptotic role of omega-3-fatty acids in developing brain: perinatal hypothyroid rat cerebellum as apoptotic model. *Int J Dev Neurosci* (2009) **27**:377–383.  
doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.02.003
  111. Mukherjee PK, Marcheselli VL, Barreiro S, Hu J, Bok D, Bazan NG. Neurotrophins enhance retinal pigment epithelial cell survival through neuroprotectin D1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) **104**:13152–13157.  
doi:10.1073/pnas.0705949104

112. Devhare P, Meyer K, Steele R, Ray RB, Ray R. Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. *Cell Death Dis* (2017) **8**:1–8. doi:10.1038/cddis.2017.517
113. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, Yao B, Shin J, Zhang F, Lee EM, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell* (2016) **18**:587–590. doi:10.1016/j.stem.2016.02.016
114. Boneva NB, Kikuchi M, Minabe Y, Yamashima T. Neuroprotective and ameliorative actions of polyunsaturated fatty acids against neuronal diseases: Implication of Fatty Acid - Binding Proteins (FABP) and G Protein - Coupled Receptor 40 (GPR40) in adult neurogenesis. *J Pharmacol Sci* (2011) **116**:163–172. doi:10.1254/jphs.10R34FM
115. Kawakita E, Hashimoto M, Shido O. Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience* (2006) **139**:991–997. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.01.021
116. Dennis DJ, Han S, Schuurmans C. bHLH transcription factors in neural development, disease, and reprogramming. *Brain Res* (2019) **1705**:48–65. doi:10.1016/j.brainres.2018.03.013
117. Katakura M, Hashimoto M, Okui T, Shahdat HM, Matsuzaki K, Shido O. Omega-3 polyunsaturated fatty acids enhance neuronal differentiation in cultured rat neural stem cells. *Stem Cells Int* (2013) **2013**: doi:10.1155/2013/490476
118. Katakura M, Hashimoto M, Shahdat HM, Gamoh S, Okui T, Matsuzaki K, Shido O. Docosahexaenoic acid promotes neuronal differentiation by regulating basic helix-loop-helix transcription factors and cell cycle in neural stem cells. *Neuroscience* (2009) **160**:651–660. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.02.057
119. Oliynyk G, Ruiz-Pérez MV, Sainero-Alcolado L, Dzieran J, Zirath H, Gallart-Ayala H, Wheelock C, Johansson HJ, Nilsson R, Lehtiö J, et al. MYCN-enhanced Oxidative and Glycolytic Metabolism Reveals Vulnerabilities for Targeting Neuroblastoma. *iScience* (2019) **21**:188–204. doi:10.1016/j.isci.2019.10.020

120. Aminzadeh S, Vidali S, Sperl W, Kofler B, Feichtinger RG. Energy metabolism in neuroblastoma and Wilms tumor. *Transl Pediatr* (2015) **4**:20–32. doi:10.3978/j.issn.2224-4336.2015.01.04
121. Zarrouk A, Nury T, Riedinger JM, Rouaud O, Hammami M, Lizard G. Dual effect of docosahexaenoic acid (attenuation or amplification) on C22:0-, C24:0-, and C26:0-Induced mitochondrial dysfunctions and oxidative stress on human neuronal SK-N-BE cells. *J Nutr Heal Aging* (2015) **19**:198–205. doi:10.1007/s12603-014-0518-0
122. Lindskog M, Gleissman H, Ponthan F, Castro J, Kogner P, Johnsen JI. Neuroblastoma cell death in response to docosahexaenoic acid: Sensitization to chemotherapy and arsenic-induced oxidative stress. *Int J Cancer* (2006) **118**:2584–2593. doi:10.1002/ijc.21555
123. Machado PRL, Araújo MIA, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An Bras Dermatol* (2004) **79**:647–662. doi:10.1590/s0365-05962004000600002
124. Pasquarelli-do-nascimento G, Braz-de-melo HA, Faria SS, Santos IDO, Kobinger GP. Hypercoagulopathy and Adipose Tissue Exacerbated Inflammation May Explain Higher Mortality in COVID-19 Patients With Obesity. (2020) **11**:1–16. doi:10.3389/fendo.2020.00530
125. Džoljić E, Grabatinić I, Kostić V. Why is nitric oxide important for our brain? *Funct Neurol* (2015) **30**:159–163. doi:10.11138/fneur/2015.30.3.159
126. Paolicelli RC, Angiari S. Microglia immunometabolism: From metabolic disorders to single cell metabolism. *Semin Cell Dev Biol* (2019) **94**:129–137. doi:10.1016/j.semcdb.2019.03.012
127. Chhatbar C, Prinz M. The roles of microglia in viral encephalitis: from sense to therapeutic targeting. *Cell Mol Immunol* (2021) **18**:250–258. doi:10.1038/s41423-020-00620-5
128. Mander PK, Jekabsone A, Brown GC. Microglia Proliferation Is Regulated by

- Hydrogen Peroxide from NADPH Oxidase. *J Immunol* (2006) **176**:1046–1052.  
doi:10.4049/jimmunol.176.2.1046
129. Rai MA, Hammonds J, Pujato M, Mayhew C, Roskin K, Spearman P. Comparative analysis of human microglial models for studies of HIV replication and pathogenesis. *Retrovirology* (2020) **17**:1–21. doi:10.1186/s12977-020-00544-y
  130. Davis RL, Buck DJ, McCracken K, Cox GW, Das S. Interleukin-1 $\beta$ -induced inflammatory signaling in C20 human microglial cells. *Neuroimmunol Neuroinflammation* (2018) **2018**: doi:10.20517/2347-8659.2018.60
  131. Jarc E, Petan T. A twist of FATE: Lipid droplets and inflammatory lipid mediators. *Biochimie* (2020) **169**:69–87. doi:10.1016/j.biochi.2019.11.016
  132. Welte MA. Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol* (2016) **25**:1–24. doi:10.1016/j.cub.2015.04.004.Expanding
  133. da Silva Gomes Dias S, Soares VC, Ferreira AC, Sacramento CQ, Fintelman-Rodrigues N, Temerozo JR, Teixeira L, da Silva MAN, Barreto E, Mattos M, et al. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLoS Pathog* (2020) **16**:1–19. doi:10.1371/journal.ppat.1009127
  134. Zhang J, Lan Y, Sanyal S. Modulation of lipid droplet metabolism-A potential target for therapeutic intervention in Flaviviridae Infections. *Front Microbiol* (2017) **8**: doi:10.3389/fmicb.2017.02286
  135. Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, Bozza PT, Gamarnik A V. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* (2009) **5**: doi:10.1371/journal.ppat.1000632
  136. Desselberger U, Desselberger U. The Significance of Lipid Droplets for the Replication of Rotaviruses and Other RNA Viruses. *J Biol* (2020) **9**:3.
  137. Thameem Dheen S, Kaur C, Ling E-A. Microglial Activation and its Implications

- in the Brain Diseases. *Curr Med Chem* (2007) **14**:1189–1197.  
doi:10.2174/092986707780597961
138. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol* (2016) **173**:649–665. doi:10.1111/bph.13139
  139. Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev* (2004) **17**:942–964. doi:10.1128/CMR.17.4.942-964.2004
  140. O’Keefe GM, Nguyen VT, Benveniste EN. Regulation and function of class II major histocompatibility complex, CD40, and B7 expression in macrophages and microglia: Implications in neurological diseases. *J Neurovirol* (2002) **8**:496–512. doi:10.1080/13550280290100941
  141. Hegde NR, Chevalier MS, Johnson DC. Viral inhibition of MHC class II antigen presentation. *Trends Immunol* (2003) **24**:278–285. doi:10.1016/S1471-4906(03)00099-1
  142. Shaikh SR, Rockett BD, Salameh M, Carraway K. Docosahexaenoic acid modifies the clustering and size of lipid rafts and the lateral organization and surface expression of MHC class I of EL4 cells. *J Nutr* (2009) **139**:1632–1639. doi:10.3945/jn.109.108720
  143. Carlsson JA, Wold AE, Sandberg AS, Östman SM. The polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and docosahexaenoic acid induce mouse dendritic cells maturation but reduce T-cell responses in vitro. *PLoS One* (2015) **10**: doi:10.1371/journal.pone.0143741
  144. Whelan J, Gowdy K, Shaikh SR. N-3 Polyunsaturated fatty acids modulate B cell activity in pre- clinical models: Implications for the immune response to infections. *Eur J Clin Pharmacol* (2017) **176**:139–148. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.100.N-3
  145. Horst D, Geerdink RJ, Gram AM, Stoppelenburg AJ, Rensing ME. Hiding lipid presentation: viral interference with CD1d-restricted invariant natural killer T

- (iNKT) cell activation. *Viruses* (2012) **4**:2379–2399. doi:10.3390/v4102379
146. Zeissig S, Murata K, Sweet L, Publicover J, Hu Z, Kaser A, Bosse E, Iqbal J, Hussain MM, Balschun K, et al. Hepatitis B virus-induced lipid alterations contribute to natural killer T cell-dependent protective immunity. *Nat Med* (2012) **18**:1060–1068. doi:10.1038/nm.2811
147. Tiwary S, Berzofsky JA, Terabe M. Altered Lipid Tumor Environment and Its Potential Effects on NKT Cell Function in Tumor Immunity. *Front Immunol* (2019) **10**:1–11. doi:10.3389/fimmu.2019.02187
148. Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. The physiological role of DC-SIGN: A tale of mice and men. *Trends Immunol* (2013) **34**:482–486. doi:10.1016/j.it.2013.03.001
149. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis* (2015) **6**:1–9. doi:10.1038/cddis.2015.162
150. Chauhan P, Lokensgard JR. Glial cell expression of PD-L1. *Int J Mol Sci* (2019) **20**:1–12. doi:10.3390/ijms20071677
151. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* (2020) **10**:727–742. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32266087>
152. Kulinski JM, Tarakanova VL, Verbsky J. Regulation of antiviral CD8 T-cell responses. *Crit Rev Immunol* (2013) **33**:477–488. doi:10.1615/CritRevImmunol.2013007909
153. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *J Virol* (2004) **78**:5535–5545. doi:10.1128/jvi.78.11.5535-5545.2004
154. Loving BA, Bruce KD. Lipid and Lipoprotein Metabolism in Microglia. *Front Physiol* (2020) **11**:1–20. doi:10.3389/fphys.2020.00393
155. O'Neill LAJ, Pearce EJ. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med* (2016) **213**:15–23. doi:10.1084/jem.20151570

156. Joshi AU, Minhas PS, Liddelow SA, Haileselassie B, Andreasson KI, Dorn GW, Mochly-Rosen D. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nat Neurosci* (2019) **22**:1635–1648. doi:10.1038/s41593-019-0486-0
157. Zhang L, Trushina E. Respirometry in neurons. *Neuromethods* (2017) **123**:95–113. doi:10.1007/978-1-4939-6890-9\_5
158. Desler C, Hansen TL, Frederiksen JB, Marcker ML, Singh KK, Juel Rasmussen L. Is there a link between mitochondrial reserve respiratory capacity and aging? *J Aging Res* (2012) **2012**: doi:10.1155/2012/192503
159. Chen L, Zhang Z, Hoshino A, Zheng HD, Morley M, Arany Z, Rabinowitz JD. NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports folate metabolism. *Nat Metab* (2019) **1**:404–415. doi:10.1038/s42255-019-0043-x
160. Graciano MF, Leonelli M, Curi R, R.Carpinelli A. Omega-3 fatty acids control productions of superoxide and nitrogen oxide and insulin content in INS-1E cells. *J Physiol Biochem* (2016) **72**:699–710. doi:10.1007/s13105-016-0509-1
161. Sorto-Gomez TE, Ortiz GG, Pacheco-Moises FP, Torres-Sanchez ED, Ramirez-Ramirez V, Macias-Islas MA, Celis de la Rosa A, Velázquez-Brizuela IE. Effect of fish oil on glutathione redox system in multiple sclerosis. *Am J Neurodegener Dis* (2016) **5**:145–151.
162. Joulain C, Prigent AF, Némoz G, Lagarde M. Increased glutathione peroxidase activity in human blood mononuclear cells upon in vitro incubation with n-3 fatty acids. *Biochem Pharmacol* (1994) **47**:1315–1323. doi:10.1016/0006-2952(94)90329-8
163. Ahmed AA, Balogun KA, Bykova N V., Cheema SK. Novel regulatory roles of omega-3 fatty acids in metabolic pathways: A proteomics approach. *Nutr Metab* (2014) **11**:1–11. doi:10.1186/1743-7075-11-6
164. Lauro C, Limatola C. Metabolic Reprograming of Microglia in the Regulation of the Innate Inflammatory Response. *Front Immunol* (2020) **11**:1–8.

doi:10.3389/fimmu.2020.00493

165. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* (80- ) (1956) **123**:309–314. doi:10.1126/science.123.3191.309
166. Liberti M V, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? (vol 41, pg 211, 2016). *Trends Biochem Sci* (2016) **41**:287. doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001.The
167. Korbecki J, Bajdak-Rusinek K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res* (2019) **68**:915–932. doi:10.1007/s00011-019-01273-5
168. Osorio D, Pinzón A, Martín-Jiménez C, Barreto GE, González J. Multiple Pathways Involved in Palmitic Acid-Induced Toxicity: A System Biology Approach. *Front Neurosci* (2020) **13**:1–14. doi:10.3389/fnins.2019.01410

## 9. Artigos e capítulos de livros publicados durante o mestrado

1. Braz-De-Melo, H.A., Pasquarelli-do-Nascimento, G., Corrêa, R., das Neves Almeida, R., de Oliveira Santos, I., Prado, P.S., et al., 2019. **Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells.** Scientific Reports. Doi: 10.1038/s41598-019-56556-y.
2. Almeida, R. das N., Braz-de-Melo, H.A., Santos, I. de O., Corrêa, R., Kobinger, G.P., Magalhaes, K.G., 2020. **The Cellular Impact of the ZIKA Virus on Male Reproductive Tract Immunology and Physiology.** Cells. Doi: 10.3390/cells9041006.
3. Pasquarelli-do-nascimento, G., Braz-de-melo, H.A., Faria, S.S., Santos, I.D.O., Kobinger, G.P., 2020. **Hypercoagulopathy and**

**Adipose Tissue Exacerbated Inflammation May Explain Higher Mortality in COVID-19 Patients With Obesity.** *Frontiers in Endocrinology*. Doi: 10.3389/fendo.2020.00530.

4. Corrêa, R., de Oliveira Santos, I., Braz-de-Melo, H.A., de Sant'Ana, L.P., das Neves Almeida, R., Pasquarelli-do-Nascimento, G., et al., 2021. **Gut microbiota modulation induced by Zika virus infection in immunocompetent mice.** *Scientific Reports*. Doi: 10.1038/s41598-020-80893-y.
5. Braz-de-Melo, H.A., Faria, S.S., Pasquarelli-do-Nascimento, G., Santos, I. de O., Kobinger, G.P., Magalhães, K.G., 2021. **The Use of the Anticoagulant Heparin and Corticosteroid Dexamethasone as Prominent Treatments for COVID-19.** *Frontiers in Medicine*. Doi: 10.3389/fmed.2021.615333.
6. das Neves Almeida, R., Braz-de-Melo, H.A., Correa, R., Magalhães, K.G., 2020. **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Quantitative Reverse Transcription PCR as a Technique to Analyze Inflammation.** *Zika Virus Methods and Protocols*, vol. 152. p. 693.

OPEN

# Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells

Heloísa Antoniella Braz-De-Melo<sup>1</sup> , Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Rafael Corrêa<sup>1</sup>, Raquel das Neves Almeida<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Paulo Sousa Prado<sup>2</sup>, Victor Picolo<sup>3</sup>, Andreza Fabro de Bem<sup>3</sup>, Nathalia Pizato<sup>4</sup> & Kelly Grace Magalhães<sup>1\*</sup> 

Zika virus (ZIKV) has a strong tropism for the nervous system and has been related to post-infection neurological syndromes. Once neuronal cells are infected, the virus is capable of modulating cell metabolism, leading to neurotoxicity and cellular death. The negative effect of ZIKV in neuron cells has been characterized. However, the description of molecules capable of reversing these cytotoxic effects is still under investigation. In this context, it has been largely demonstrated that docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 polyunsaturated fatty acid, is highly neuroprotective. Here, we hypothesized that DHA's neuroprotective properties could have an influence on ZIKV-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Our data showed that pre-treatment of SH-SY5Y cells with DHA increased the cell viability and proliferation in ZIKV-infected cells. Moreover, DHA triggered an anti-inflammatory response in those infected cells. Besides, DHA was capable of restoring mitochondria function and number in ZIKV-infected SH-SY5Y cells. In addition, cells pre-treated with DHA prior to ZIKV infection presented a lower viral load at different times of infection. Taking together, these results demonstrated that DHA has a potential anti-inflammatory and neuroprotective effect against ZIKV infection in these neuron-like cells and could be a useful tool in the treatment against this virus.

First discovered in Uganda Forest in 1947, Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne Flavivirus, transmitted by mosquitoes from *Aedes* genus, and, as recently discovered, an arbovirus sexually transmitted<sup>1,2</sup>. ZIKV has been associated with several neuronal alterations and congenital diseases<sup>3</sup>. Indeed, ZIKV is closely related to neurological disorders and presents a main tropism for nervous system, being isolated from animals born with microcephaly and infected adult mice brain<sup>4,5</sup>. Neuronal cells, both progenitors or differentiated ones, suffer a loss of homeostasis when infected with ZIKV and present considerable changes in cell metabolism during infection, due to the presence of specific required metabolites for viral replication<sup>6,7</sup>. ZIKV-induced neuronal alterations can directly impair neuronal homeostasis leading to decreased cellular proliferation and differentiation capacity of those cells, followed by cell death<sup>7</sup>.

It was also reported that negative influence of ZIKV in neuronal cells has a strong relationship with mitochondrial-sequestration of phospho-TBK1, an important factor that once relocated can cause a disruption in mitosis process, creating a critical environment to neuronal survival<sup>8</sup>. In addition, specific ZIKV proteins are capable of inhibiting Akt-mTOR pathway in neuronal stem cells, which plays essential role on neurogenesis process, cell maturation and migration<sup>9,10</sup>. Such mechanisms act synergistically to induce neuronal apoptotic cell death and loss of massive cell population during brain development and it can be accompanied by activation of inflammatory response<sup>7,11,12</sup>.

It is known that inflammation is a key process that orchestrates neuronal damage induced by ZIKV infection<sup>13</sup>. It has been reported that ZIKV intensively induces the generation of pro-inflammatory factors in microglia cells, such as IL-6 and MCP-1, when it infects human fetal brain<sup>14</sup>. In addition, pro-inflammatory response triggered

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, Brazil. <sup>2</sup>Central Laboratory of Federal District (LACEN), 70830-010, Brasília, Brazil. <sup>3</sup>Department of Physiological Sciences, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, Brazil. <sup>4</sup>Department of Nutrition, University of Brasília (UnB), 70910-900, Brasília, Brazil. \*email: [kellymagalhaes@unb.br](mailto:kellymagalhaes@unb.br)

by ZIKV in neuronal cells can be mediated by NLRP3 inflammasome activation, in a reactive oxygen species generation dependent manner, suggesting that oxidative stress plays an important role on ZIKV pathogenicity<sup>15</sup>. Besides, neurotoxic factors released by infected neurons are important to promote neuronal cell death during ZIKV infection<sup>12</sup>. Therefore, molecules with the ability to modulate inflammation could be useful to inhibit ZIKV pathogenicity. It has been demonstrated that Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6(omega-3)), a polyunsaturated fatty acid derived from omega-3 family, can inhibit NLRP3 inflammasome<sup>16,17</sup> and reduce intracellular reactive oxygen species<sup>18</sup>.

DHA is an essential fatty acid, therefore, it cannot be synthesized by *de novo* cell pathways and must be acquired by diet, mainly from cold water fish, or its oil intake, or from  $\alpha$ -linoleic omega-3 fatty acid metabolism<sup>19</sup>. DHA has been described to be essential for normal function of diverse cell types of the organism, protecting against cardiovascular diseases and influencing positively retinal cells survival<sup>20,21</sup>. Moreover, the central impact of DHA in the organism can also be related to neuroprotection, increasing longevity of neuronal cells and decreasing neurodegeneration, inflammation and cognitive decline<sup>22</sup>.

Neurons and glial cells retain high levels of DHA in their cell membrane and this presence can positively influence electrochemical potential, membrane excitability, cell signaling and project an environment capable of maintaining cell integrity once homeostasis is threatened<sup>23,24</sup>. DHA also produces a potent lipid anti-inflammatory mediator called neuroprotectin-D1, a specialized pro-resolving mediator, which has anti-apoptotic actions, anti-oxidative properties, up-regulating the expression of proteins that induces cell survival, such as Bcl-2 and Bcl-xL<sup>25</sup>.

Here, we hypothesized that omega-3 (DHA) could protect against ZIKV-induced neurotoxicity. It is still unknown the effect of DHA supplementation during ZIKV infection in experimental neuronal-like models. Therefore, the aim of this work was to evaluate whether neuroprotective properties provide by DHA could have an influence against ZIKV infection in human SH-SY5Y cells.

## Results

**DHA protects against ZIKV-induced cytotoxicity.** We first analyzed the ability of omega-3 DHA to modulate cell viability during ZIKV infection in SH-SY5Y cells. Cell viability of human SH-SY5Y cells was analyzed by MTT assay in ZIKV-infected or uninfected cells after 24, 48, 72 and 96 hours of infection, in the presence or not of omega-3 DHA pre-treatment (Fig. 1a). We observed that ZIKV significantly reduced SH-SY5Y cells viability from 72 hours forward compared to uninfected cells. At 96 hours, ZIKV triggered a 50% loss of SH-SY5Y cells viability. Considering these results, we decided to investigate whether omega-3 DHA could protect SH-SY5Y cells from cell viability loss observed at 96 hours of infection. We verified that DHA greatly restored cell viability of the ZIKV-infected SH-SY5Y cells (Fig. 1b).

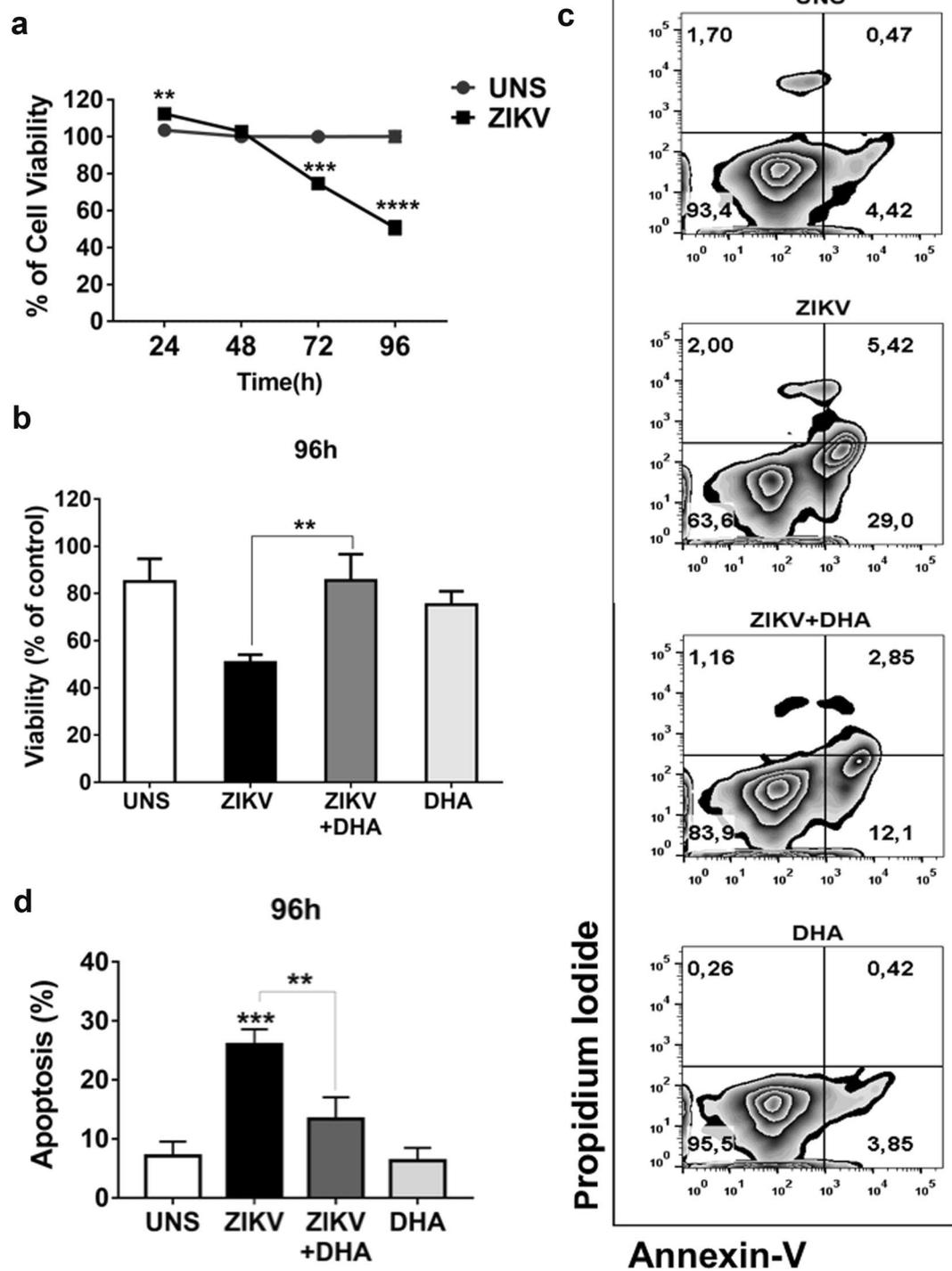
We also investigated what kind of induced cell death would be related to this reduction of cell viability caused by ZIKV. After 96 hours of infection, human SH-SY5Y cell death was evaluated and we observed that ZIKV triggered an increased apoptotic cell death compared to control cells (Fig. 1c). Apoptotic cell death was quantified (Fig. 1d) and DHA pre-treatment significantly decreased the number of apoptotic cells induced by ZIKV infection, restoring the number of viable cells (Fig. 1d).

**DHA enhances proliferative capacity of ZIKV infected cells.** We analyzed the ability of omega-3 DHA to modulate cell proliferation during ZIKV infection in SH-SY5Y cells. We observed that ZIKV infection did not alter significantly the cell proliferation of the SH-SY5Y cells after 96 h of infection (Fig. 2A,B). However, DHA pre-treated cells prior to ZIKV infection presented a higher cell proliferation activity compared with infected cells in the absence of DHA (Fig. 2A,B). This result was further confirmed when we analyzed cell cycle of these cells under similar experimental condition. ZIKV infection did not modify significantly the percentage of cells in G2/M phase when compared with uninfected cells after 72 h of infection (Fig. 2C). Moreover, DHA pre-treated cells prior to ZIKV infection presented a significantly higher percentage of cells in G2/M phase (Fig. 2C), indicating that omega-3 DHA has the ability to enhance cell proliferation ability of ZIKV-infected SH-SY5Y cells.

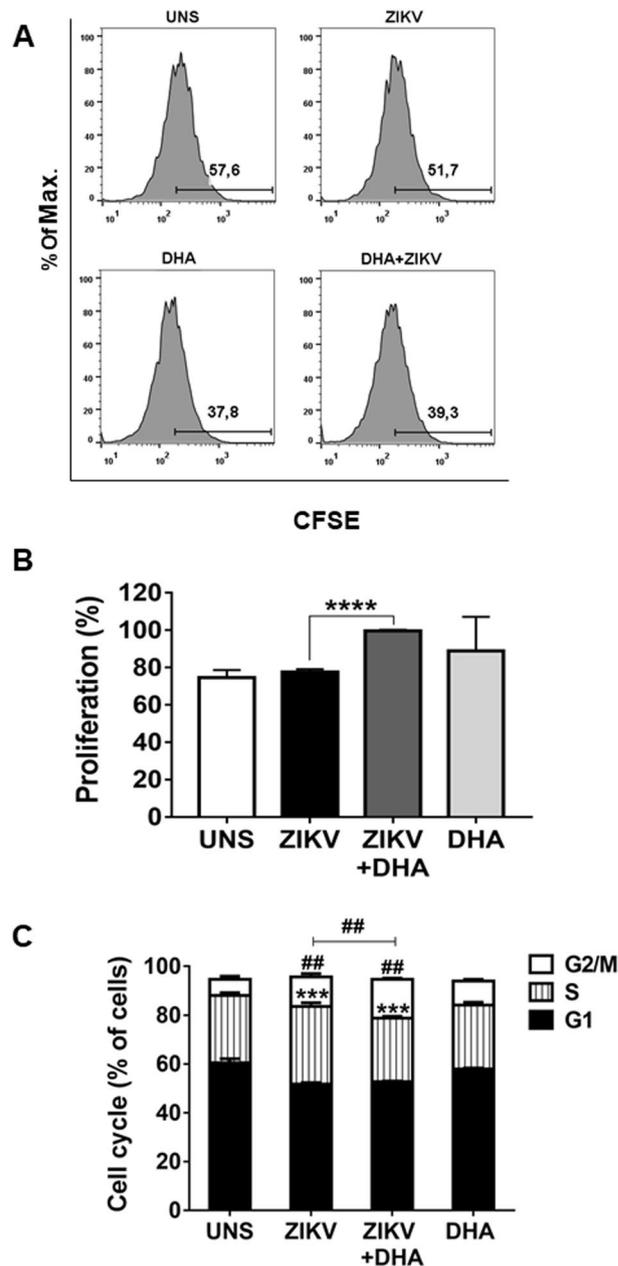
**DHA softens pro-inflammatory response induced by ZIKV infection.** We analyzed whether ZIKV infection could modulate the secretion of cytokines, chemokines and lipid mediators by SH-SY5Y cells, after 24, 48, 72 and 96 hours of infection. We observed that ZIKV infection induced a pro-inflammatory profile in SH-SY5Y cells by triggering the secretion of higher levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and the chemokine MCP-1, since initial times of infection (24 h) (Fig. 3a,b). DHA pre-treatment was capable of reducing this secretion at 48 and 72 hours for MCP-1 and at 96 hours of infection for IL-6, where this cytokine had its apex of secretion compared to other times.

It was also analyzed an anti-inflammatory cytokine during ZIKV infection and the role of omega-3 DHA in this process. For this, we analyzed TGF- $\beta$  secretion in ZIKV-infected SH-SY5Y cells after 24, 48, 72 and 96 hours of infection. We observed that ZIKV decreased TGF- $\beta$  secretion at 72 hours of infection (Fig. 3c). Moreover, DHA pre-treatment was capable of increasing TGF- $\beta$  secretion levels at 24 and 96 hours of infection in these cells. IL-10 was also measured, but no significant differences were observed in all conditions and time points analyzed (data not shown).

We also investigated whether ZIKV could modulate the secretion of a lipid inflammatory mediator, the Leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and the role of omega-3 DHA in this process. We observed that ZIKV did not have any influence in LTB<sub>4</sub> secretion SH-SY5Y cells after 96 hours of infection. Similarly, DHA pre-treatment prior to ZIKV infection did not significantly modified LTB<sub>4</sub> levels (Fig. 3d). Taking together, these results demonstrated that DHA pre-treatment has a potential to soften exacerbated inflammatory profile induced by ZIKV, not only by decreasing pro-inflammatory factors, but also increasing an anti-inflammatory cytokine. Although DHA pre-treatment decreased pro-inflammatory cytokine levels, it is important to emphasize that it does not abrogate the secretion of these mediators by the pre-treated cells, allowing an important factor for the activation of immune response against ZIKV infection.

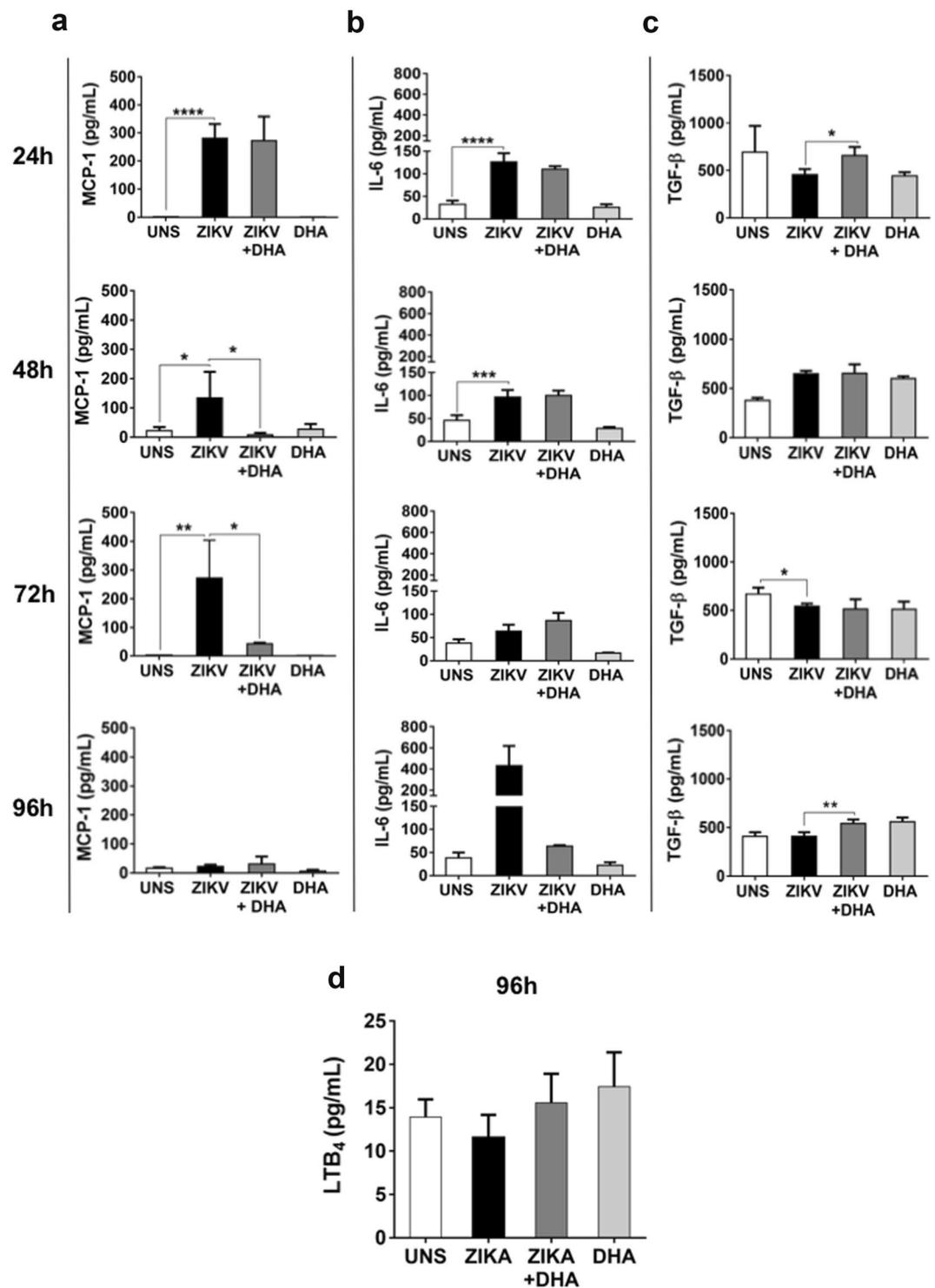


**Figure 1.** SH-SY5Y cells were infected with ZIKV (MOI 10). After 24, 48, 72 and 96 hours of infection cellular viability was assessed by 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay and analyzed by spectrophotometry. **(a)** SH-SY5Y cells were pre-treated (or not) with DHA (12,5  $\mu$ M) before ZIKV (MOI 10) infection. After 96 hours, cellular viability was assessed by MTT assay and analyzed by spectrophotometry. **(b)** All MTT graphs were made using GraphPad Prism version 6.00. Additionally, SH-SY5Y cells were treated (or not) with DHA (12,5  $\mu$ M) before ZIKV infection (MOI 10) and after 96 hours apoptotic and lytic cellular death was evaluated by staining cells with Annexin V and Propidium Iodide, analyzed thereafter by flow cytometry. **(c)** The dot plot is representative of three independent experiments and was made using FlowJo Version 9. A quantitative graph of Annexin-V/PI assay using data from three independent experiments was also performed. **(d)** All experiments here were performed in quintuplicate, each being repeated at least three times independently. P values are represented by asterisks:  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) and  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).



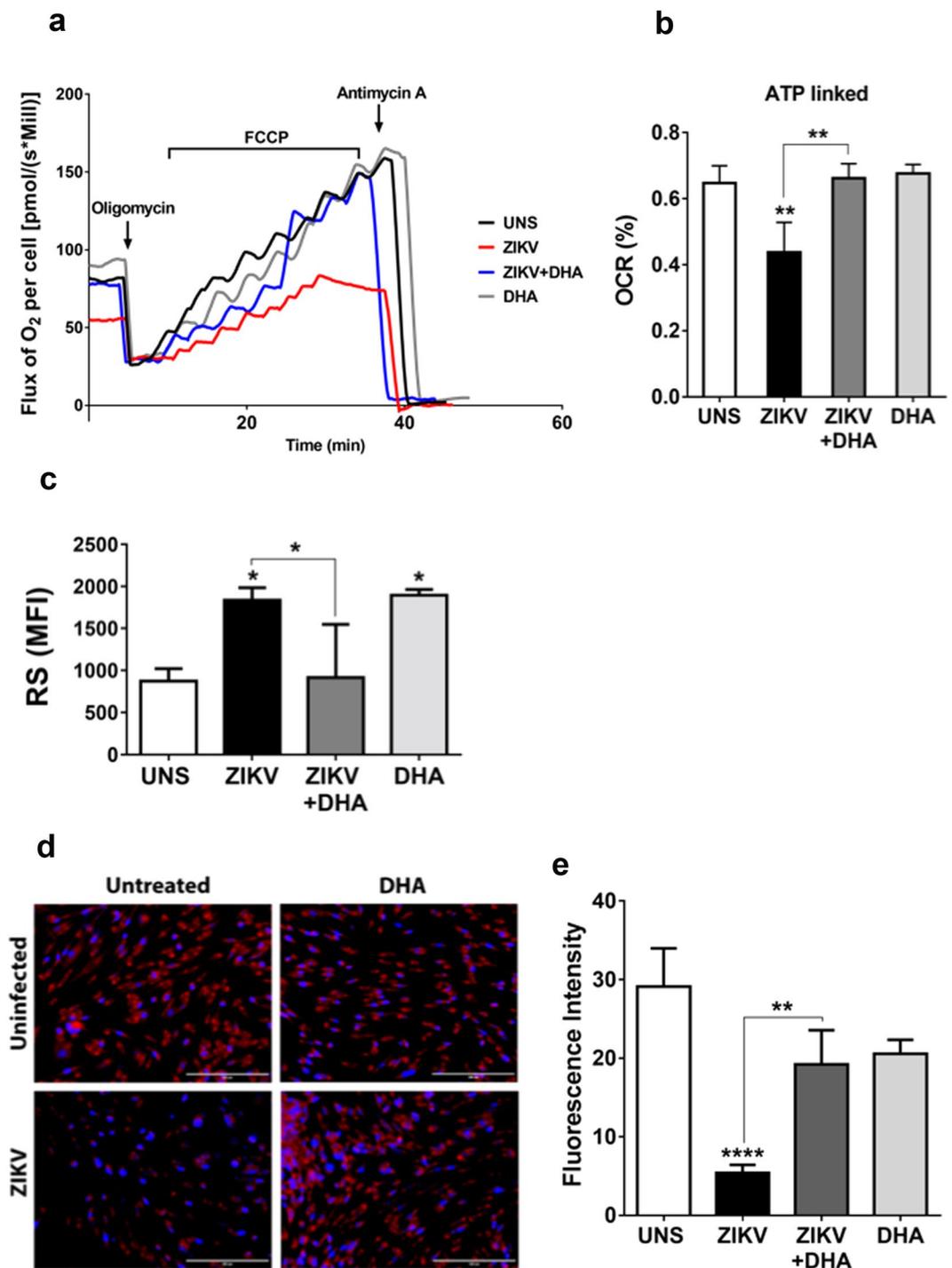
**Figure 2.** SH-SY5Y cells were pre-treated (or not) with DHA before ZIKV infection (MOI 10). After 96 hours, cell proliferation was assessed by Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) staining and analyzed by flow cytometry. (A) Histograms are representatives of three independent experiments and were made using FlowJo Version 9. A quantitative graph of CFSE was also performed using data from three independent experiments. (B) Here, asterisks represent statistical significance with  $p < 0.001$  (\*\*\*\*). Additionally, SH-SY5Y cells were pre-treated (or not) with DHA (12,5  $\mu$ M) before ZIKV infection (MOI 10) and after 72 hours, cell cycle was assessed by Propidium Iodide staining and analyzed by flow cytometry. (C) Flow cytometry data were plotted in the graph using GraphPad Prism. All experiments here were performed in triplicate, each being repeated at least three times independently. Here, symbols represent statistical significance comparing the untreated ZIKV infected cells with DHA-treated ZIKV infected cells in the G2/M phase (\*\* $p \leq 0.001$ ) or in the S phase (\*\* $p \leq 0.01$ ).

**DHA prevents the mitochondrial dysfunction and reactive species production induced by ZIKV.** Getting deeper into the mechanisms through which ZIKV induced SH-SY5 cell death, cellular oxygen consumption was evaluated through a high resolution respirometry assay. The mitochondrial function of SH-SY5Y cells was determined after 48 hours after ZIKV infection, a period of time where cell viability was not affected by the virus (Fig. 4a,b). We observed that mitochondrial dysfunction was induced by ZIKV SH-SY5Y cells, even before cell death had been noticed. Routine respiration was lower in ZIKV-infected cells in the absence of the DHA pre-treatment compared with untreated or uninfected cells. In addition, oxygen consumption

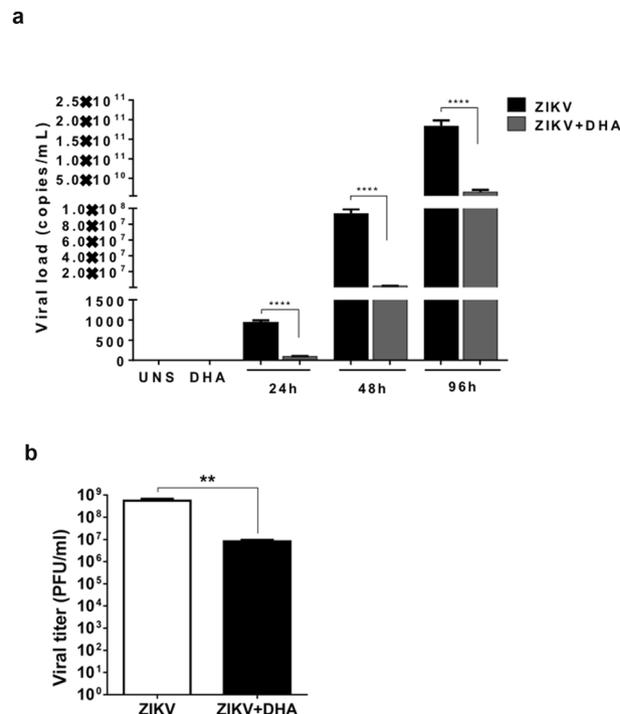


**Figure 3.** SH-SY5Y cells were pre-treated (or not) with DHA (12,5  $\mu$ M) before ZIKV infection (MOI 10) and after 24, 48, 72 and 96 hours, inflammatory cytokines and chemokines released in the supernatant as MCP-1 (a), IL-6 (b), and TGF- $\beta$  (c), was assessed by ELISA. Lipid inflammatory mediator Leukotriene B<sub>4</sub> was also assessed in the supernatant only at 96 hours of infection. (e) All the experiments above mentioned were analyzed by spectrophotometry and graphs were made using GraphPad Prism Version 6.00. Here, asterisks represent statistical significance with  $p \leq 0.05$  (\*) and  $p \leq 0.01$  (\*\*). All experiments here were performed in quintuplicate, each being repeated at least three times independently.

directed to ATP synthesis (ATP-linked) was lower on ZIKV-infected cells compared to uninfected cells, suggesting that mitochondrial damage by ZIKV can start at initial times of infection. DHA also restored ATP-linked oxygen consumption, protecting against SH-SY5Y cells mitochondrial dysfunction triggered by ZIKV infection.



**Figure 4.** SH-SY5Y cells were pre-treated with DHA (12,5  $\mu$ M) before ZIKV infection (MOI 10) and after 48 hours, oxygen consumption rate (OCR) (a) and ATP-linked (b) was evaluated with a high respirometry assay under different inhibitors action, as oligomycin (1,25  $\mu$ M), FCCP (100 nM) and antimycin-A (2,5  $\mu$ M). Graphs were made using GraphPad Prism Version 6.00. SH-SY5Y cells were pre-treated (or not) with DHA (12,5  $\mu$ M) before ZIKV infection (MOI 10) and after 96 hours, reactive species was assessed by 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) and analyzed by flow cytometry. (c) Graphs were made using GraphPad Prism Version 6.00. This experiment was performed in quintuplicate, each being repeated at least three times independently. Additionally, SH-SY5Y cells were pre-treated (or not) with DHA (12,5  $\mu$ M) before ZIKV infection (MOI 10) and live mitochondria were assessed by MitoTracker staining and analyzed by fluorescence microscopy. (d) Fluorescence intensity obtained in the independent experiments was quantified using ImageJ. (e) This experiment was performed in triplicate, each being repeated at least three times independently. Asterisks represent statistical significance with  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) and  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).



**Figure 5.** SH-SY5Y cells were pre-treated (or not) with DHA (12,5 µM) and after 24, 48 and 96 hours of infection, intracellular viral load was assessed by RNA extraction and analyzed by RT-qPCR. **(a)** This experiment was performed in triplicate. Additionally, SH-SY5Y cells pre-treated (or not) with DHA (12,5 µM) and after 96 hours of ZIKV infection, viral titers quantification was assessed by TCID-50 (50% Tissue culture Infective Dose), followed by further mathematical conversion to PFU. **(b)** This experiment was performed in sextuplicate. Asterisks represent statistical significance with  $p \leq 0.01$  (\*\*) and  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).

Taking into account that ZIKV-mediated cell damage could be related to oxidative stress, we investigated whether DHA can protect SH-SY5Y cells from ZIKV-induced reactive species generation. At initial times (3 and 24 hours), reactive species generation was not modulated (data not shown). After 96 hours of infection (Fig. 4c), considered a late time of infection, ZIKV significantly increased reactive species generation compared to uninfected cells. However DHA pre-treatment was capable of preventing reactive species generation in ZIKV-infected cells.

Then, we addressed whether ZIKV could impair the number of viable mitochondria in SH-SY5Y cells and whether omega-3 DHA could protect cells from this damage. For this, MitoTracker staining was performed in SH-SY5Y cells and analyzed by fluorescence microscopy. It was possible to observe that ZIKV infected cells presented the lowest amount of live cells and a significant reduction of viable mitochondria compared to all other conditions analyzed (Fig. 4d). Moreover, DHA pre-treatment prior to ZIKV infection was capable of protecting against ZIKV-induced loss of mitochondria viability (Fig. 4d,e), corroborating with MTT assay (Fig. 1b).

**DHA reduces ZIKV load and cytopathic effect in infected cells.** Finally, we addressed whether changes in mitochondrial function and other intracellular parameters by omega-3 could have an impact on viral load in SH-SY5Y cells infected with ZIKV. For this, we analyzed the viral burden in DHA pre-treated or untreated SH-SY5Y cells infected with ZIKV. The results showed that ZIKV is significantly increasing its charge over times of infection, getting at  $10^{11}$  viral copies/mL at 96 hours. Surprisingly, when SH-SY5Y cells were pre-treated with DHA prior to ZIKV exposure, the viral load significantly decreased in all times tested ( $p < 0,01$ ), since 24 hours of infection. This suggests that cellular modulation exerted by DHA in ZIKV-infected SH-SY5Y cells may occur since early periods and may play an important role in the reduction of viral particles that could trigger cell death observed at later periods of infection. In addition, we also investigated whether omega-3 DHA could have an impact on the cytopathic effect triggered by ZIKV in SH-SY5Y cells by performing a PFU assay after 96 hours of infection (Fig. 5b). Here, we observed that ZIKV triggered cytopathic effects in SH-SY5Y cells, and omega-3 DHA may have a protective effect in this process, since cells pre-treated with DHA prior to ZIKV infection presented a diminished number of plaque-forming units compared to untreated cells infected with ZIKV (Fig. 5b).

## Discussion

Taking into account the scenario of neuronal alterations caused by ZIKV, this paper explored neuroprotective properties derived from the omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) docosahexaenoic acid (DHA). This PUFA is widely studied as a bioactive anti-inflammatory nutrient and is also an important component of neuronal membrane, playing key roles in intracellular mechanisms that leads to neuronal survival on a stressful

environment<sup>19,22,26</sup>. Despite the fact of both ZIKV and DHA effects on neuronal cells have already been elucidated, there is nothing exploring how they could influence each other, once ZIKV and DHA have opposite effects on the same cell type<sup>12,22</sup>. For this reason, the present study is a pioneer in the neuroprotection field provided by DHA against ZIKV infection, and, at the same time, appends to the scarce literature about this fatty acid effects on diverse infections<sup>27,28</sup>.

SH-SY5Y cells are widely used as an important model for approaches focused on neuronal cells physiology and neurological diseases and several studies have provided very pertinent biological and pharmacological findings using SH-SY5Y as a neuronal-like *in vitro* model<sup>29–34</sup>. In our work, we could observe that ZIKV decreased SH-SY5Y cells viability in a time-dependent manner, corroborating with other studies that uses the same cell line<sup>31,33</sup>. At initial times, as 24 and 48 hours of infection, ZIKV maintained cell viability around 100%. However, despite there is no cell death induction at these times, ZIKV caused intracellular alterations that will be essential for triggering SH-SY5Y cells loss of viability at later times of infection, specifically from 72 hours<sup>12</sup>. In this context, DHA neuroprotective properties were tested in a pre-treatment prior to ZIKV infection for 96 hours. This time point was chosen due to the massive cell viability loss observed at that moment. Even at this harmful environment caused by four days of ZIKV infection, we found that DHA could restore a major percentage of cell viability, compared to untreated cells. This counter-effect could be better analyzed when we looked for more specific mechanisms involved in the SH-SY5Y cell death caused by ZIKV. Indeed, ZIKV-induced apoptotic cell death has already been reported<sup>4,7,11</sup>. Here, we demonstrated that DHA played an important role on protecting more than a half of the cell population. It was expected since omega-3 fatty acids are capable of preventing neuronal apoptosis under different conditions<sup>35–37</sup>.

We also looked for any modulation on cell cycle and proliferative capacity on SH-SY5Y cells. For this, we analyzed cell proliferation by CFSE assay and cell cycle looking at the phases related to mitosis process, known as G2/M phases. It has been demonstrated that ZIKV can decrease cell proliferation of the neuronal progenitor cells<sup>6,8</sup>. Here we demonstrated that ZIKV did not modify SH-SY5Y cell proliferation, neither G2/M phase of the cell cycle progression in SH-SY5Y cells. Therefore, the loss of SH-SY5Y cells viability observed in previous experiments was related to ZIKV-induced cell death and not by any modulation of proliferative capacity of the immortalized neuronal cell. Nevertheless, DHA pre-treatment prior to ZIKV infection increased the percentage of ZIKV infected cells proliferating (on G2/M phase) compared to untreated cells. Indeed, PUFAs have the ability of stimulating intracellular pathways related to neuronal proliferation<sup>19,38</sup>.

Another important field to explore is the modulation of inflammatory response to ZIKV infection and the role of omega-3 DHA in this process SH-SY5Y cells<sup>12,19</sup>. We observed that ZIKV increased the secretion of pro-inflammatory components, especially IL-6 and MCP-1 since initial times of infection, in agreement with a previous work that described an inflammatory profile of astrocyte and microglia during ZIKV infection<sup>14,39</sup>. On the other hand, DHA pre-treatment was capable of softening pro-inflammatory components induced by ZIKV in addition to increasing secretion of anti-inflammatory cytokine TGF- $\beta$ . It is important to emphasize that inflammatory profile plays a relevant function during ZIKV pathogenesis in different cell types<sup>40</sup>, but, at the same time, immune system activation is essential for combating the infection<sup>41,42</sup>. A balance between anti- and pro-inflammatory agents is the key for homeostasis restoration. In this context, DHA reduced significantly inflammatory markers in ZIKV-infected SH-SY5Y cells, but it maintained the secretion of these molecules at a sufficient level for activating the immune response to eliminate the infection. Checking other inflammatory mediators, it was also explored whether ZIKV could modulate the secretion of a lipid inflammatory mediator, the Leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), and the role of omega-3 DHA in this process. We observed that ZIKV did not have any influence in LTB<sub>4</sub> secretion in SH-SY5Y cells after 96 hours of infection. As already described<sup>43</sup>, DHA can be retroconverted in eicosapentaenoic acid (EPA), a 20 carbon omega-3 fatty acid family<sup>44</sup>. EPA produces Leukotrien B<sub>5</sub> (LTB<sub>5</sub>), which is less potent eicosanoid mediator than LTB<sub>4</sub>, originated from arachidonic acid, an n-6 family fatty acid<sup>45</sup>. DHA treatment could enhance LTB<sub>5</sub> production modulating LTB<sub>4</sub> effects on SH-SY5Y cells. However, no differences on LTB<sub>4</sub> secretion were observed among all conditions analyzed here.

ZIKV-induced mitochondria stress was previously reported in neuronal stem cells. This study showed that ZIKV infection causes mitochondrial apoptosis in neuronal stem cells via mitochondrial sequestration of phospho-TBK1 during mitosis<sup>8</sup>. Our results showed that ZIKV caused mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y cells as early as 48 hours of infection, therefore earlier than cell death induction (that occurred after 72 hours). High resolution respirometry analysis showed a significant reduction on ATP-linked oxygen consumption rate in ZIKV-infected SH-SY5Y cells. Differently from neuronal stem cells that mostly rely on the glycolysis form energy production, mature neurons depend on OXPHOS to sustain its high metabolic rate<sup>46</sup>. In this sense, we may suggest that ZIKV modulates the cellular metabolism in SH-SY5Y cells, impairing the energy demand and making these cells particularly vulnerable to oxidative stress and apoptosis. In fact, we verified that mitochondrial dysfunction at the early stage of ZIKV infection later culminated in effective cell death<sup>47</sup>. For concluding mitochondrial alterations in this context, we looked for amount of viable mitochondria and we noticed that there was a considerable reduction on viable mitochondria on ZIKV infected cells. By contrast, the pre-treatment of SH-SY5Y cells with omega-3 DHA turned cells more efficient to resist to ZIKV-induced metabolic changes. DHA efficiently restored the mitochondrial dysfunction induced by ZIKV and preserved the mitochondrial viability after 72 hours of ZIKV infection in SH-SY5Y cells.

At later times of ZIKV infection, where inflammatory profile is harmful and cell death processes are being triggered, ZIKV infected cells presented higher levels of reactive species. In the other hand, DHA pre-treated cells prior to ZIKV infection presented generation of the reactive species in levels very similar to uninfected cells. Reactive species are important factors on triggering cellular damage and present a role on activation of NLRP3 inflammasome during ZIKV infection<sup>15</sup>. Reactive species generation reduction induced by omega-3 DHA in ZIKV-infected SH-SY5Y cells, suggests a protection property of DHA against cellular damage and it could trigger inhibition of the NLRP3 inflammasome activation, as an anti-inflammatory mechanism.

After exploring a couple of effects that are modulated by ZIKV, we asked whether DHA responses could influence on intracellular viral load throughout different times of infection. We observed that viral load was significantly decreased in the presence of DHA, since initial times (24 hours). We also quantified infective virus particle by a cytotoxicity assay, which also demonstrated that DHA was capable of reducing ZIKV particles that could induce SH-SY5Y cell death.

As conclusion, we showed that ZIKV infection of SH-SY5Y cells induced reactive species production and mitochondrial dysfunction. These alterations in mitochondrial function can be suggested as an important factor for increased apoptotic events triggered by ZIKV in SH-SY5Y cells. In contrast, DHA pre-treatment of SH-SY5Y cells inhibited RS production and restored mitochondria functionality that was disturbed by ZIKV infection. Consequently, apoptosis was inhibited in those cells and cell viability was maintained. DHA pre-treatment softens secretion of pro-inflammatory cytokines and increase the secretion of anti-inflammatory TGF- $\beta$ . This work also showed that DHA stimulation was capable of decreasing viral load in infected cells, suggesting that DHA responses on SH-SY5Y cells protects from ZIKV-induced neurotoxicity and interfered on viral load production in those cells.

Therefore, our results suggest that omega-3 DHA can induce alterations on SH-SY5Y cells that may keep them more resistant against ZIKV infection by: (I) reducing cell death and increasing cell viability; (II) enhancing cell proliferation; (III) softening pro-inflammatory response; (IV) preventing mitochondrial dysfunction and reactive species production; and (V) reducing viral load and virus infectivity. This effect is not just preventing ZIKV neurotoxicity, but also interfering on its own viral load production and their infectivity. The decrease of viral particles can dramatically impact the effects observed on ZIKV pathogenesis. Hence, our findings revealed that the omega-3 DHA has a neuroprotective effect on neuronal-like cells SH-SY5Y against ZIKV infection. Taking together, our work presents important mechanisms that may be involved in this neuroprotective function of this PUFA against ZIKV infection and confirms the potential of novel applications of omega-3 fatty acids as protective agents against viral infection that could impact neuronal tissue.

## Methods

**Cell line and virus stocks.** Human neuroblastoma cells (ATCC SH-SY5Y) were cultured in Dulbecco's Modified Essential (DMEM) and F12 Medium, supplemented with 2% of fetal bovine serum and 100  $\mu$ M of Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich) and maintained at 37 °C and 5% of CO<sub>2</sub>. All the experiments bellow were performed with SH-SY5Y cell line, the model of human neuronal-like lineage. For virus expansion process, it was used C6/36 mosquito cell line cultured in TC-100 medium and supplemented with 2% of fetal bovine serum, both acquired from Sigma Aldrich, maintained at 37 °C in absence of CO<sub>2</sub>. Vero cell line (ATCC CCL-81) was also used for viral expansion, cultured in DMEM and supplemented with 10% of fetal bovine serum. ZIKV<sub>PE243</sub> (gene bank reference number KX197192) was kindly provided by Dr. Rafael Freitas de Oliveira França (FIOCRUZ, PE, Brazil) after isolation in 2015 from a human case that occurred in the state of Pernambuco (Brazil). The virus was propagated in C6/36 and, after one passage, propagated as well in Vero cells. Stocks were aliquoted and frozen at -80 °C, where each vial was used a single time. Viral titers were determined by plaque-forming unit (PFU) and confirmed by RT-PCR.

**Pre-treatment and Infection.** SH-SY5Y cells were pre-treated with docosahexaenoic acid (DHA-Sigma-Aldrich) on a concentration of 12.5  $\mu$ M and incubated for one hour. After treatment, cells were once washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) and infected thereafter. As a control, cells were incubated with DMEM 2% in absence of DHA. SH-SY5Y cells, pre-treated and non-treated, were infected with ZIKV<sub>PE243</sub> (MOI 10) and were incubated for 2 hours in 37 °C and 5% of CO<sub>2</sub>. After this time of infection, DMEM supplemented with 2% of fetal bovine serum was added and the cells remained in the incubator during 24, 48, 72 and 96 hours, according to the analysis. Uninfected cells were used as a negative control.

**Cell viability by MTT Assay.** SH-SY5Y cells were plated in 96-well plates (n = 4) and pre-treated (or not) with DHA and infected (or not) after treatment with ZIKV. After 24, 48, 72 and 96 hours of infection, cell viability dependent on mitochondrial activity was evaluated by 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT Sigma-Aldrich) in a concentration of 10% (stocks concentration at 5 mg/ml diluted in Phosphate Buffered Saline). The plates were incubated at 37 °C and 5% of CO<sub>2</sub> for 1 hour and then analyzed by spectrophotometry at 570 nm.

**Cell death analysis by Annexin V and PI.** SH-SY5Y cells were plated in 24-well plates pre-treated with DHA and posteriorly infected with ZIKV (as control untreated and/or uninfected cells), and after 96 hours of infection, cell death was analyzed by flow cytometry (FACSVerse) and using FITC Annexin V Apoptosis detection Kit I (BD Biosciences) and Propidium Iodide (Sigma-Aldrich). This experiment was performed in triplicate, each being repeated at least three times independently.

**Proliferation analysis by CFSE.** SH-SY5Y cells were plated in 24-well plates and were marked with Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) (Thermo Fisher), in a concentration of 5  $\mu$ M. Cells were incubated with CFSE for fifteen minutes protected from light at room temperature, then were blocked with DMEM and F12 supplemented 10% of fetal bovine serum. Pre-treatment (or non-treatment) and infections (as control uninfected cells) were made thereafter and cells were incubated, protected from light, for 96 hours. Proliferative capacity was analyzed by Flow Cytometry, using a FACSVerse, after incubation. This experiment was performed in triplicate, each being repeated at least three times independently.

**Cell-cycle analysis by PI.** In order to evaluate the impact of pre-treatments on SH-SY5Y cell cycle, cells were seeded in 24 well plates (n = 3) and exposed to ZIKV or DHA or both. After 72 hours of incubation, cells were detached and fixed using ethanol 70% (v/v) for 2 hours. Cells were then resuspended in 50  $\mu$ L of PI solution [0.1%

sodium citrate (v/v), 0.1% Triton-X (v/v), 20 µg/mL propidium iodide, 50 µg/mL RNase, phosphate buffer saline (PBS)] at pH 7.4 and incubated for 30 min at room temperature. Cells were diluted in PBS and analyzed using a FACSVerse flow cytometry (Becton & Dickenson, USA) using linear scale. A total of 10,000 events were obtained per sample. This experiment was performed in triplicate, each being repeated at least three times independently.

**Inflammatory profile by ELISA.** After 24, 48, 72 and 96 hours of infection, secretion of the cytokines IL-6, IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  and the chemokine MCP-1 was analyzed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) following the recommendations of manufacturer (BD Biosciences) and analyzed by spectrophotometry at 450 nm. This experiment was performed in quintuplicate, each being repeated at least three times independently.

**Leukotriene B<sub>4</sub> dosage.** After 96 hours of infection, SH-SY5Y cells supernatant was used for leukotriene B<sub>4</sub> measurement. The experiment was made using Cayman Chemical Leukotriene B<sub>4</sub> ELISA kit following the recommendations of manufacturer. This experiment was performed in quintuplicate, each being repeated at least three times independently.

**Intracellular reactive species analysis.** SH-SY5Y cells were plated in a 24-well plate, pre-treated with DHA and posteriorly infected with ZIKV, with uninfected and/or untreated cells as control. 96 hours after infection and treatments, intracellular reactive species (RS) were stained with 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (Sigma-Aldrich), in a concentration of 20 µM. The staining was done with cells added to the plate for minimizing stresses that occur during cell detaching process and cells were incubated for 30 minutes at culture conditions, followed by serial washes and fixation. After fixation with Formalin (3.7%), cells were suspended and RS generation was measured using a FACSVerse flow cytometry (Becton & Dickenson, USA). This experiment was performed in triplicate, each being repeated at least three times independently.

**High-resolution respirometry.** To evaluate the mitochondrial oxygen consumption, SH-SY5Y cells were plated in a 24-well plate, DHA pre-treated (or not) and infected with ZIKV, using as control uninfected cells. After 48 hours of infection, approximately 10<sup>6</sup> cells were suspended in DMEM and F12 in the absence bovine fetal serum. Oxygen consumption rate (OCR) was measured using a high-resolution respirometer (OROBOROS Oxygraph-2k) at 37 °C, continuous stirring at 750 rpm and a final volume of 2 mL. For calibration of the equipment, in each experiment day was used DMEM and F12, the same medium used for cell culture. The basal OCR was calculated upon stabilization of oxygen flux and after cell the addition. Different substrates were added to the chamber containing cells and oxygen consumption measured after stabilization of the signal. As substrates, were used Olygomycin 1.25 µM, from which ATP-linked OCR could be obtained in the final analysis; Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphen-ylhydrazine (FCCP) in pulses of 100 nM, in order to analyze maximum respiratory capacity; At last, respiration was inhibited by Antimycin-A 2.5 µM, in order to analyze residual oxygen consumption (ROX). The ATP-linked OCR was presented as the difference between the OCR before (basal respiration) and after (proton leaking) addition of Olygomycin, normalized by the basal respiration. This experiment was performed in quintuplicate, each being repeated at least three times independently.

**Mitochondrial detection by microscopy.** SH-SY5Y cells were plated on a coverslip, in a 24-well plate, pre-treated with DHA and posteriorly infected with ZIKV, with uninfected and/or untreated cells as control. After 72 hours of infection and treatments, mitochondria of living cells were marked by MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher), in a concentration of 100 nM. The reagent was diluted in DMEM and F12 medium without fetal bovine serum and cells were exposed to MitoTracker for 45 minutes. After staining, cells were vigorously washed with PBS and then fixed for 15 minutes with Formalin (3.7%). After fixation, cells were washed again and had their nucleus marked with 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) for 5 minutes, in a DAPI/PBS ratio of 1:5000. After washes, samples were analyzed on EVOS Cell Imaging Systems fluorescence microscope (Thermo Fisher). Fluorescence quantification was performed using ImageJ software. This experiment was performed in triplicate, each being repeated at least three times independently.

**Viral load by RT-PCR.** To monitor viral loads, RT-PCR was conducted after RNA extraction of SH-SY5Y cells treated (or not) and infected with ZIKV (or not). RNA extraction (as described previously by Prado *et al.*<sup>48</sup>) was made by High Pure Viral Nucleic Acid Version 18 Kit (Roche Diagnosis), with a single step reaction provided by LightCycler Multiplex RNA Virus Master Version 03 (Roche Diagnosis). RNA standards, in a final volume of 20 µl, were reverse transcribed; Primer concentration was 0.5 µM and probe was used in a concentration of 200 nM. A standard curve, with a serial dilution of known titration virus, was also made by RT-PCR to calculate viral loads per mL. This experiment was performed in triplicate, each being repeated at least three times independently.

**Viral titers protocol- TCID<sub>50</sub> assay.** SH-SY5Y was evaluated in two conditions: DHA-treated and non-treated ZIKV-infected cells and analyzed for TCID<sub>50</sub> (50% Tissue Culture Infective Dose). For endpoint TCID<sub>50</sub> determination 60000 cells were plated and grown into 96 wells plate. They were inoculated thereafter with 10<sup>-1</sup>-fold dilution of ZIKV samples. The endpoint titration resulted in final ZIKV dilutions of 10<sup>-1</sup>-10<sup>-9</sup> fold on the cells in n = 6. Cells were incubated for 4-5 days at 37 °C and monitored to ZIKV- induced cytopathic effect and plaque formation. TCID<sub>50</sub>/mL was calculated according to Reed and Muench method<sup>49</sup>. After TCID<sub>50</sub> obtained values, the PFU/ml was predicted using Poisson distribution, which multiplies the TCID<sub>50</sub> titer (per ml) by 0.7 to predict the mean number of PFU/ml.

**Statistical analysis.** All experiments here were performed at least in triplicate, each being repeated at least three times independently. Mean  $\pm$  standard deviation (SD) are shown for the number of replicates of each experiment ( $n \geq 3$ ), those are specified in *Figures Legend*. For flow cytometry graphs, mean  $\pm$  standard deviation represents the merging of the obtained data of three independent experiments. Statistical analysis was made using GraphPad Prism (6.00) and the statistical test for multiple comparisons were made with one-way ANOVA and the Tukey post-test. P values are represented by asterisks:  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) and  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).

Received: 9 September 2019; Accepted: 11 December 2019;

Published online: 27 December 2019

## References

1. Lowe, R. *et al.* The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *Environmental Research and Public Health* **15**, 1–18 (2018).
2. Mead, P. S., Hills, S. L. & Brooks, J. T. Zika virus as a sexually transmitted pathogen. *Current Opinion in Infectious Diseases* **30**, 39–44 (2017).
3. Moore, C. A. *et al.* Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatrics* **171**, 288–295 (2016).
4. Martinot, A. J. *et al.* Fetal Neuropathology in Zika Virus-Infected Pregnant Female Rhesus Monkeys. *Cell* **173**, 1111–1122.e10 (2018).
5. Li, H. *et al.* Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell* **19**, 593–598 (2016).
6. Devhare, P., Meyer, K., Steele, R., Ray, R. B. & Ray, R. Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. *Cell Death and Disease* **8**, 1–8 (2017).
7. Rothan, H. A., Fang, S., Mahesh, M. & Byrareddy, S. N. Zika Virus and the Metabolism of Neuronal Cells. *Molecular Neurobiology* **56**, 2551–2557 (2018).
8. Onorati, M. *et al.* Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. *Cell Reports* **16**, 2576–2592 (2016).
9. Liang, Q. *et al.* Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* **19**, 663–671 (2016).
10. Lee, D. Y. Roles of mTOR Signaling in Brain Development. *Experimental Neurobiology* **24**, 177 (2015).
11. Souza, B. S. F. *et al.* Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Scientific Reports* **6**, 1–13 (2016).
12. Olmo, I. G., Carvalho, T. G., Costa, V. V. & Alves-silva, J. Zika Virus Promotes neuronal cell Death in a non-cell autonomous Manner by Triggering the release of neurotoxic Factors. *Frontiers in Immunology* **8**, 1–14 (2017).
13. Lawrence, T. & Gilroy, D. W. Chronic inflammation: A failure of resolution? *International Journal of Experimental Pathology* **88**, 85–94 (2007).
14. Lum, F. M. *et al.* Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. *Clinical Infectious Diseases* **64**, 914–920 (2017).
15. He, Z. *et al.* NLRP3 Inflammasome Activation Mediates Zika Virus-Associated Inflammation. *Journal of Infectious Diseases* **217**, 1942–1951 (2018).
16. Li, G. *et al.* NLRP3 inflammasome as a novel target for docosahexaenoic acid metabolites to abrogate glomerular injury. *Journal of Lipid Research* **58**, 1080–1090 (2017).
17. Yan, Y. *et al.* Omega-3 Fatty Acids Prevent Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity* **38**, 1154–1163 (2013).
18. Sakai, C. *et al.* Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. *PloS One* **12**, 1–13 (2017).
19. Dyall, S. C. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in Aging Neuroscience* **7**, 1–15 (2015).
20. Anil, E. The impact of EPA and DHA on blood lipids and lipoprotein metabolism: Influence of apoE genotype. *Proceedings of the Nutrition Society* **66**, 60–68 (2007).
21. Querques, G., Forte, R. & Souied, E. H. Retina and omega-3. *Journal of Nutrition and Metabolism* **2011**, 1–12 (2011).
22. Kim, H.-Y. Neuroprotection by Docosahexaenoic Acid in Brain Injury. *Military Medicine* **179**, 106–111 (2014).
23. Bazan, N. G. Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **10**, 136–141 (2007).
24. Med, B. J., Res, B. & Leonelli, M. TRP channels, omega-3 fatty acids, and oxidative stress in neurodegeneration: from the cell membrane to intracellular cross-links. *Brazilian Journal of Med. and Biol. Research* **44**, 1088–1096 (2011).
25. Bazan, N. G. Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **15**, 159–166 (2005).
26. Bazan, N. G., Calandria, J. M. & Gordon, W. C. Docosahexaenoic acid and its derivative neuroprotectin d1 display neuroprotective properties in the retina, brain and central nervous system. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series* **77**, 121–131 (2013).
27. Husson, M., Ley, D., Portal, C. & Gottrand, M. Modulation of host defence against bacterial and viral infections by omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Infection* **4453**, 1–32 (2016).
28. Jones, G. J. B. & Roper, R. L. The effects of diets enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids on systemic vaccinia virus infection. *Scientific Reports* **159**, 1–6 (2017).
29. Kalia, M., Khasa, R., Sharma, M., Nain, M. & Vrati, S. Japanese Encephalitis Virus Infects Neuronal Cells through a Clathrin-Independent Endocytic Mechanism. *Journal of Virology* **87**, 148–162 (2013).
30. Losev, Y. *et al.* Novel model of secreted human tau protein reveals the impact of the abnormal N-glycosylation of tau on its aggregation propensity. *Scientific Reports* **9**, 2254 (2019).
31. Alpuche-Lazcano, S. P. *et al.* Higher cytopathic effects of a zika virus brazilian isolate from Bahia compared to a Canadian-imported thai strain. *Viruses* **10**, 1–15 (2018).
32. DU, X. *et al.* Enterovirus 71 induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells through stimulation of endogenous microRNA let-7b expression. *Molecular Medicine Reports* **12**, 953–959 (2015).
33. Luplertlop, N. *et al.* The impact of zika virus infection on human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. *Journal of Vector Borne Diseases* **54**, 207–214 (2017).
34. Xicoy, H., Wieringa, B. & Martens, G. J. M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration* **12**, 1–10 (2017).
35. Suphioglu, C. *et al.* The omega-3 fatty acid, DHA, decreases neuronal cell death in association with altered zinc transport. *FEBS Letters* **584**, 612–618 (2010).

36. Kim, H. Y., Akbar, M. & Lau, A. Effects of docosapentaenoic acid on neuronal apoptosis. *Lipids* **38**, 453–457 (2003).
37. Florent, S. *et al.* Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid- $\beta$  oligomers. *Journal of Neurochemistry* **96**, 385–395 (2006).
38. Hee-Young Kim, M. A. & Phosphatidylserine-dependent, Y.-S. K. neuroprotective signaling promoted by docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **5**, 379–390 (2010).
39. Stefanik, M. *et al.* Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. *BMC Neuroscience* **19**, 1–8 (2018).
40. Ojha, C. R. *et al.* Complementary mechanisms potentially involved in the pathology of Zika virus. *Frontiers in Immunology* **9**, 1–12 (2018).
41. Quicke, K. M. & Suthar, M. S. The innate immune playbook for restricting West Nile virus infection. *Viruses* **5**, 2643–2658 (2013).
42. Culshaw, A., Mongkolsapaya, J. & Screaton, G. The immunology of Zika Virus. *F1000Research* **7**, 1–9 (2018).
43. Bennett, M. & Gilroy, D. W. Lipid Mediators in Inflammation. *Microbiology Spectrum* **4**, 1–21 (2016).
44. Croset, M., Pachiardi, C., Riots, J. P., Nicole, J. & The, M. L. Retroconversion and metabolism of [ $^{13}\text{C}$ ]22:6n-3 in humans and rats after intake of a single dose of [ $^{13}\text{C}$ ]22:6n-3-triacylglycerols. *Amer. Soc. for Clin. Nut.* **64**, 577–586 (1996).
45. Calder, P. C. Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes. *Nutrients* **2**, 355–374 (2010).
46. Agathocleous, M. *et al.* Metabolic differentiation in the embryonic retina. *Nature Cell Biology* **14**, 859–864 (2012).
47. Agapite, J. & Steller, H. Neuronal cell death. *Ame. Phys. Soc.* **98**, 813–880 (2009).
48. Prado, P. S. *et al.* Validation and reliability of the rapid diagnostic test ‘SD Bioeasy Dengue Duo’ for dengue diagnosis in Brazil: a phase III study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**, 1–8 (2018).
49. Muench, Reed, L. J. & Muench, H. A Simple Method Of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *The American Journal of Hygiene* **27**, 493–497 (2018).

## Acknowledgements

We would like to thank our financial support provided by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq # 312359/2016-0), Fundação de Amparo a Pesquisa do Distrito Federal (FapDF/PPSUS # 193.001.621/2016) and Wellcome Trust (24076\*1\*014).

## Author contributions

K.G.M. Designed the experiments and wrote the manuscript. N.P. Wrote the manuscript. A.F.B. Wrote the manuscript. H.A.B.M. Performed the experiments and wrote the manuscript. G.P. Performed PI-cycle and Proliferation analysis and wrote the manuscript. R.C. Handled FACS Verse equipment and FlowJo analysis. P.S.P. Performed RT-qPCR analysis. V.P. Performed High Resolution Respirometry. R.N.A. and I.O.S. performed viral expansion and TCID 50 assay. All authors analyzed the results and reviewed the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to K.G.M.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher’s note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Review

# The Cellular Impact of the ZIKA Virus on Male Reproductive Tract Immunology and Physiology

Raquel das Neves Almeida <sup>1</sup>, Heloisa Antoniella Braz-de-Melo <sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos <sup>1</sup>, Rafael Corrêa <sup>1</sup>, Gary P. Kobinger <sup>2,3</sup> and Kelly Grace Magalhaes <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, 70910–900 Brasilia, Distrito Federal, Brazil; raquel.unb.bio@gmail.com (R.d.N.A.); heloisa.antoniella@gmail.com (H.A.B.-d.-M.); igorosantosbio@gmail.com (I.d.O.S.); rafaelcorrea31@gmail.com (R.C.)

<sup>2</sup> Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Université Laval, Quebec City, QC G1V 4G2, Canada; Gary.Kobinger@crchudequebec.ulaval.ca

<sup>3</sup> Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec-Université Laval, Quebec City, QC G1V 4G2, Canada

\* Correspondence: kellymagalhaes@unb.br; Tel.: +55-61-3107-3099-3103

Received: 11 March 2020; Accepted: 15 April 2020; Published: 18 April 2020



**Abstract:** Zika virus (ZIKV) has been reported by several groups as an important virus causing pathological damage in the male reproductive tract. ZIKV can infect and persist in testicular somatic and germ cells, as well as spermatozoa, leading to cell death and testicular atrophy. ZIKV has also been detected in semen samples from ZIKV-infected patients. This has huge implications for human reproduction. Global scientific efforts are being applied to understand the mechanisms related to arboviruses persistency, pathogenesis, and host cellular response to suggest a potential target to develop robust antiviral therapeutics and vaccines. Here, we discuss the cellular modulation of the immunologic and physiologic properties of the male reproductive tract environment caused by arboviruses infection, focusing on ZIKV. We also present an overview of the current vaccine effects and therapeutic targets against ZIKV infection that may impact the testis and male fertility.

**Keywords:** Sertoli cells; Leydig cells; ZIKA virus; arboviruses; infertility

## 1. Introduction

The testis is a reproductive gland that is part of the internal structures of the male reproductive tract (MRT) and is involved in spermatogenesis and steroidogenesis. Each testis is composed of a tangle of tubes, the seminiferous ducts. These ducts are formed by Sertoli cells (SCs) and the germinal epithelium, which is responsible for ensuring protection and nutrition to accurate spermatogenesis. Leydig cells (LCs) are found in the testis interstitium, adjacent to the seminiferous tubules. LCs promote steroidogenesis through the secretion of male sex hormones, especially testosterone, responsible for the development of male genital organs and secondary sexual characters [1,2].

The testis is considered an immune-privileged organ [3]. This is essential to ensure the immunogenic germ cell protection against immune system activation during spermatogenesis. This is mainly provided by the combination of a local immunosuppressive environment and systemic immune tolerance [4–6]. It has long been assumed that the blood–testis barrier (BTB) constitutes the main mechanism of the immune-privileged status of the testis [7]. In addition to BTB and anatomical impairment of external cells' and molecules' entrance to testis, SCs also provide anti-inflammatory mediator secretion aiming to maintain the tolerogenic microenvironment [8]. However, many local immune modulators, including macrophages, dendritic cells (DCs), natural killer cells (NKs), mast cells and T-lymphocytes, contribute to the intercommunication among testicular components [9–12].



# Hypercoagulopathy and Adipose Tissue Exacerbated Inflammation May Explain Higher Mortality in COVID-19 Patients With Obesity

Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Heloísa Antoniella Braz-de-Melo<sup>1</sup>, Sara Socorro Faria<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Gary P. Kobinger<sup>2,3</sup> and Kelly Grace Magalhães<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil,

<sup>2</sup> Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Université Laval, Quebec City, QC, Canada, <sup>3</sup> Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec - Université Laval, Quebec City, QC, Canada

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Jeff M. P. Holly,  
University of Bristol, United Kingdom

### Reviewed by:

Luca Spiezia,  
University of Padova, Italy  
Erik Albert Karlsson,  
Institut Pasteur du  
Cambodge, Cambodia

### \*Correspondence:

Kelly Grace Magalhães  
kellymagalhaes@unb.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Obesity,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

**Received:** 03 June 2020

**Accepted:** 30 June 2020

**Published:** 28 July 2020

### Citation:

Pasquarelli-do-Nascimento G,  
Braz-de-Melo HA, Faria SS,  
Santos IO, Kobinger GP and  
Magalhães KG (2020)  
Hypercoagulopathy and Adipose  
Tissue Exacerbated Inflammation May  
Explain Higher Mortality in COVID-19  
Patients With Obesity.  
*Front. Endocrinol.* 11:530.  
doi: 10.3389/fendo.2020.00530

COVID-19, caused by SARS-CoV-2, is characterized by pneumonia, lymphopenia, exhausted lymphocytes and a cytokine storm. Several reports from around the world have identified obesity and severe obesity as one of the strongest risk factors for COVID-19 hospitalization and mechanical ventilation. Moreover, countries with greater obesity prevalence have a higher morbidity and mortality risk of developing serious outcomes from COVID-19. The understanding of how this increased susceptibility of the people with obesity to develop severe forms of the SARS-CoV-2 infection occurs is crucial for implementing appropriate public health and therapeutic strategies to avoid COVID-19 severe symptoms and complications in people living with obesity. We hypothesize here that increased ACE2 expression in adipose tissue displayed by people with obesity may increase SARS-CoV-2 infection and accessibility to this tissue. Individuals with obesity have increased white adipose tissue, which may act as a reservoir for a more extensive viral spread with increased shedding, immune activation and pro-inflammatory cytokine amplification. Here we discuss how obesity is related to a pro-inflammatory and metabolic dysregulation, increased SARS-CoV-2 host cell entry in adipose tissue and induction of hypercoagulopathy, leading people with obesity to develop severe forms of COVID-19 and also death. Taken together, it may be crucial to better explore the role of visceral adipose tissue in the inflammatory response to SARS-CoV-2 infection and investigate the potential therapeutic effect of using specific target anti-inflammatories (canakinumab or anakinra for IL-1 $\beta$  inhibition; anti-IL-6 antibodies for IL-6 inhibition), anticoagulant or anti-diabetic drugs in COVID-19 treatment of people with obesity. Defining the immunopathological changes in COVID-19 patients with obesity can provide prominent targets for drug discovery and clinical management improvement.

**Keywords:** adipose tissue, COVID-19, Obesity, SARS-CoV-2, hypercoagulopathy, ACE-2

## INTRODUCTION

On December 2019, a series of pneumonia cases without a recognized etiology was reported in Wuhan, a central China city (1). Rapidly spreading throughout the globe, Coronavirus disease (COVID-19) was recently discovered to be caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The World Health Organization (WHO) declared SARS-CoV-2



OPEN

## Gut microbiota modulation induced by Zika virus infection in immunocompetent mice

Rafael Corrêa<sup>1</sup>, Igor de Oliveira Santos<sup>1</sup>, Heloísa Antoniella Braz-de-Melo<sup>1</sup>, Lívia Pimentel de Sant'Ana<sup>1</sup>, Raquel das Neves Almeida<sup>1</sup>, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento<sup>1</sup>, Paulo Sousa Prado<sup>2</sup>, Gary P. Kobinger<sup>3,4</sup>, Corinne F. Maurice<sup>5</sup> & Kelly Grace Magalhães<sup>1</sup>✉

Gut microbiota composition can modulate neuroendocrine function, inflammation, and cellular and immunological responses against different pathogens, including viruses. Zika virus (ZIKV) can infect adult immunocompetent individuals and trigger brain damage and antiviral responses. However, it is not known whether ZIKV infection could impact the gut microbiome from adult immunocompetent mice. Here, we investigated modifications induced by ZIKV infection in the gut microbiome of immunocompetent C57BL/6J mice. Adult C57BL/6J mice were infected with ZIKV and the gut microbiota composition was analyzed by next-generation sequencing of the V4 hypervariable region present in the bacterial 16S rDNA gene. Our data showed that ZIKV infection triggered a significant decrease in the bacteria belonging to Actinobacteria and Firmicutes phyla, and increased Deferribacteres and Spirochaetes phyla components compared to uninfected mice. Interestingly, ZIKV infection triggered a significant increase in the abundance of bacteria from the Spirochaetaceae family in the gut microbiota. Lastly, we demonstrated that modulation of microbiota induced by ZIKV infection may lead to intestinal epithelium damage and intense leukocyte recruitment to the intestinal mucosa. Taken together, our data demonstrate that ZIKV infection can impact the gut microbiota composition and colon tissue homeostasis in adult immunocompetent mice.

Zika Virus (ZIKV) is an Arbovirus member of the Flaviviridae family that is mainly transmitted by the bite of *Aedes* genus mosquitoes<sup>1</sup>. During the 2015 outbreak, ZIKV spread quickly in America, mainly in Brazil<sup>2</sup>. During ZIKV dissemination, non-vector born routes of infection were reported, including sexual transmission<sup>3</sup>. A great concern about ZIKV's impact worldwide was the association of post-infection disorders, such as Guillain-Barré syndrome<sup>4</sup>, and the development of congenital malformations<sup>5</sup>.

As a means of better understanding ZIKV pathogenesis, most of the molecular mechanisms associated with the infection were elucidated with the use of genetically-induced immunodeficient mice models<sup>6</sup>. In those reports, infected mice presented weight loss, high viremia, detectable signs of illness, intensive neuronal loss, immune system activation on neuronal surroundings, and severe testicular inflammation<sup>6–8</sup>. In contrast, the impact of ZIKV on immunocompetent adult mice models showed detectable viral loads in the serum, and effects on different organs or lethality after infection through different routes<sup>9,10</sup>. Despite this, ZIKV induces innate and adaptive immune responses that are essential for protecting the organism against the establishment of disease<sup>11,12</sup>. The immune system activation demonstrates that specific parameters are modulated during ZIKV infection such that, regardless of the milder symptoms, the virus still impacts on the host<sup>13</sup>. These findings lead to new questions regarding if other alterations could be linked to viral activation of the host's immune system and modulation of physiological functions not noticed before.

The gut microbiota has been described as a strong modulator of inflammatory and immune responses, both locally and systemically<sup>14,15</sup>, playing essential roles in triggering host responses against pathogen infections<sup>16</sup>. In recent years, studies have shown that the gut microbiota influences and is influenced by viral infections<sup>17</sup>. This study reports that enteric viruses can lead to substantial disturbances in gut microbiota composition, impacting

<sup>1</sup>Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil. <sup>2</sup>Central Laboratory of Federal District (LACEN), Brasilia, Brazil. <sup>3</sup>Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Université Laval, Quebec, Canada. <sup>4</sup>Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec-Université Laval, Quebec, Canada. <sup>5</sup>Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, Canada. ✉email: kellymagalhaes@unb.br



# The Use of the Anticoagulant Heparin and Corticosteroid Dexamethasone as Prominent Treatments for COVID-19

*Heloisa Antoniella Braz-de-Melo*<sup>1</sup>, *Sara Socorro Faria*<sup>1</sup>,  
*Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento*<sup>1</sup>, *Igor de Oliveira Santos*<sup>1</sup>, *Gary P. Kobinger*<sup>2,3</sup> and  
*Kelly Grace Magalhães*<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cell Biology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil,

<sup>2</sup> Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Université Laval, Quebec City, QC, Canada, <sup>3</sup> Centre de Recherche en Infectiologie du CHU de Québec, Université Laval, Quebec City, QC, Canada

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Ana Afonso,  
University of São Paulo, Brazil

### Reviewed by:

Frank M. P. Van Haren,  
Australian National University, Australia  
Naveen Kumar Devanga Ragupathi,  
The University of Sheffield,  
United Kingdom  
Clive P. Page,  
King's College London,  
United Kingdom

### \*Correspondence:

Kelly Grace Magalhães  
kellymagalhaes@unb.br  
orcid.org/0000-0002-7435-5272

### Specialty section:

This article was submitted to  
Infectious Diseases - Surveillance,  
Prevention and Treatment,  
a section of the journal  
Frontiers in Medicine

**Received:** 08 October 2020

**Accepted:** 26 March 2021

**Published:** 23 April 2021

### Citation:

Braz-de-Melo HA, Faria SS,  
Pasquarelli-do-Nascimento G,  
Santos IO, Kobinger GP and  
Magalhães KG (2021) The Use of the  
Anticoagulant Heparin and  
Corticosteroid Dexamethasone as  
Prominent Treatments for COVID-19.  
*Front. Med.* 8:615333.  
doi: 10.3389/fmed.2021.615333

COVID-19 is spreading worldwide at disturbing rates, overwhelming global healthcare. Mounting death cases due to disease complications highlight the necessity of describing efficient drug therapy strategies for severe patients. COVID-19 severity associates with hypercoagulation and exacerbated inflammation, both influenced by ACE2 downregulation and cytokine storm occurrence. In this review, we discuss the applicability of the anticoagulant heparin and the anti-inflammatory corticosteroid dexamethasone for managing severe COVID-19 patients. The upregulated inflammation and blood clotting may be mitigated by administering heparin and its derivatives. Heparin enhances the anticoagulant property of anti-thrombin (AT) and may be useful in conjunction with fibrinolytic drugs for severe COVID-19 patients. Besides, heparin can also modulate immune responses, alleviating TNF- $\alpha$ -mediated inflammation, impairing IL-6 production and secretion, and binding to complement proteins and leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). Moreover, heparin may present anti-SARS-CoV-2 potential once it can impact viral infectivity and alter SARS-CoV-2 Spike protein architecture. Another feasible approach is the administration of the glucocorticoid dexamethasone. Although glucocorticoid's administration for viral infection managing is controversial, there is increasing evidence demonstrating that dexamethasone treatment is capable of drastically diminishing the death rate of patients presenting with Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) that required invasive mechanical ventilation. Importantly, dexamethasone may be detrimental by impairing viral clearance and inducing hyperglycemia and sodium retention, hence possibly being deleterious for diabetics and hypertensive patients, two major COVID-19 risk groups. Therefore, while heparin's multitarget capacity shows to be strongly beneficial for severe COVID-19 patients, dexamethasone should be carefully administered taking into consideration underlying medical conditions and COVID-19 disease severity. Therefore, we suggest that the multitarget impact of heparin as an anti-viral, antithrombotic and anti-inflammatory drug



## Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Quantitative Reverse Transcription PCR as a Technique to Analyze Inflammation

Raquel das Neves Almeida, Heloisa Antoniella Braz-de-Melo, Rafael Corrêa, and Kelly Grace Magalhães

### Abstract

Inflammation is part of a defense reaction of live tissues that is triggered by pathogens, chemical reagents, trauma, and radiation. Understanding the inflammatory process triggered by *Zika virus* (ZIKV) is important to better understand the pathogen-host interaction. The evaluation of this process can be done using tools such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). Both techniques have been an indispensable tool not just for immunologists but for all interested in understanding the inflammatory process.

**Key words** Inflammation, ZIKA virus infection, RT-qPCR, ELISA, Antigens, Cytokines, Chemokines

---

### 1 Introduction

The testicle is an immune-privileged environment that acts as a blood-testis barrier for the suppression of normal immune responses that could lead to inflammation to protect germ cells from a systemic immune attack [1]. Several infections can break down the testicular homeostasis and impact in the male testicular health, as often observed in some patients infected with Zika virus (ZIKV) [2]. ZIKV infection can modulate the testicular immunity and lead to orchitis, promoting viral replication and persistence and the establishment of the virus in the male reproductive tract [3]. In mice model, ZIKV can infect distinct types of cells in the male reproductive tract, preferentially spermatogonia, primary spermatocytes, and Sertoli cells. Sertoli cells can support high levels of ZIKV replication. In the other cell types, such as spermatogonia, the infection can promote cell death leading to the destruction of seminiferous tubules [4].