

Mariangela Souza de Oliveira Ribeiro

**Efeito do Atazanavir, da Curcumina e do Lopinavir
nas vias canônica e não canônica do NF- κ B
determinantes de resposta inflamatória em
neuroblastoma SK e em células mononucleares do
sangue periférico de gestantes incubadas *in vitro* com o
vírus Zika**

TESE DE DOUTORADO

**Universidade de Brasília
Brasília/DF
2023**

Efeito do Atazanavir, da Curcumina e do Lopinavir nas vias canônica e não canônica do NF- κ B determinantes de resposta inflamatória em neuroblastomas SK e em células mononucleares do sangue periférico de gestantes incubadas *in vitro* com o vírus Zika

Mariangela Souza de Oliveira Ribeiro

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

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

**BRASÍLIA/DF
2023**

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

S048e Souza deOliveira, Mariangela
Efeito do Atazanavir, da Curcumina e do Lopinavir nas
vias canônica e não canônica do NF- κ B determinantes de
resposta inflamatória em neuroblastoma SK e em células
mononucleares do sangue periférico de gestantes incubadas in
vitro com o vírus Zika / Mariangela Souza deOliveira;
orientador Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira. --
Brasília, 2023.
215 p.

Tese(Doutorado em Patologia Molecular) -- Universidade de
Brasília, 2023.

1. NF κ B. 2. Vírus Zika. 3. Gestantes. 4.
Neuroblastomas SK. 5. Citocinas. I. Muniz Barboza Junqueira,
Maria Imaculada, orient. II. Título.

A banca examinadora foi constituída pelos seguintes membros:

Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira (Presidente)

Érica Alessandra Rocha Alves (membro externo- FIOCRUZ/MG)

Anamélia Lorenzetti Bocca (membro do PPGPM- UnB)

Fabiana Pirani Carneiro (1ºSuplente- SES-DF e PPGCM-UnB)

Selma Aparecida Souza Kückelhaus (2ºSuplente- PPGCM-UnB e PPGMT-UnB)

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, que me abençoou em todos os momentos desta jornada, ao meu filho, que é o meu maior presente e a minha maior motivação, à minha família e a todas as mulheres que trilham seus caminhos na ciência, que enfrentam desafios, preconceitos e obstáculos, mas não desistem de seus sonhos e de suas vocações.

Agradecimentos

Agradeço à professora Dr^a Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, minha orientadora e maior incentivadora, por ter me guiado com sabedoria, rigor e entusiasmo. A senhora é uma referência acadêmica e humana para mim.

Agradeço à professora Dr^a Tatiana Karla dos Santos Borges, por ter me ajudado em partes dos experimentos e na obtenção dos dados da citometria de fluxo, além de promover momentos de descontração.

Agradeço à Shirley Claudino Pereira Couto, minha amiga e parceira de experimentos, por ter compartilhado comigo as dificuldades e as conquistas desta jornada. Você é uma pessoa incrível e uma pesquisadora de excelência.

Agradeço ao professor Dr Gustavo Romero, pelo incentivo e apoio financeiro para viabilizar a pesquisa. O senhor é um líder visionário e generoso.

Agradeço ao professor Dr André Nicola, pelo incentivo e esclarecimento de dúvidas sobre os experimentos.

Agradeço ao professor Dr Alexandre de M. V. Machado e a Dr^a Ketyllen Reis, da Fiocruz-MG, por terem me recebido, transmitido conhecimentos relacionados ao cultivo e manejo de cultura de Zika e doado as amostras virais e celulares, que viabilizaram a pesquisa. Vocês são uma equipe de referência.

Agradeço à Dr^a Erica Alessandra Rocha Alves, que abriu as portas de sua casa para me receber durante o treinamento que fiz na Fiocruz-MG. Você é uma anfitriã acolhedora e uma grande cientista.

Agradeço ao Alessandro, técnico da secretaria do PPGPM da UnB, por todas as vezes que ajudou administrativamente e pelos esclarecimentos de todas as dúvidas relacionadas ao programa de Patologia Molecular.

Agradeço à Marinete e Maria Solange, trabalhadoras terceirizadas da UnB, pela preocupação e cuidado durante os dias de realização dos experimentos. Vocês são pessoas maravilhosas.

Agradeço a todas as voluntárias da minha pesquisa, que gentilmente aceitaram participar deste estudo e colaboraram com as coletas de dados e amostras. Em especial, agradeço às gestantes, que mesmo em um momento delicado, como foi a pandemia de COVID, vocês abriram as portas de suas casas para me receber e contribuir com esse trabalho. Vocês são mulheres guerreiras e admiráveis.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, fonte de toda sabedoria e amor, por ter me dado forças para superar os desafios e concluir esta etapa tão importante da minha vida.

Agradeço à minha mãe, Jaci Maria, por ter sido meu exemplo de perseverança e generosidade. A senhora é a minha inspiração e a razão de eu estar aqui hoje.

Agradeço ao meu esposo, Jean C. Ribeiro, por ter me apoiado nessa, com paciência, compreensão e carinho.

Agradeço ao meu filho, Lucas Souza Ribeiro, por ter me dado alegria, motivação e orgulho. Você é o meu maior tesouro e a minha maior realização.

Agradeço às minhas irmãs Dayanne, Iolanda e Conceição, por toda ajuda nesse período, pelo amor e cuidado com meu filho e pelo empenho na captação de voluntárias para a pesquisa. Vocês são mais do que irmãs, são minhas amigas e companheiras.

Agradeço à minha cunhada Karla Dias, por me ajudar nas coletas de sangue.

Agradeço aos meus irmãos, cunhadas e cunhados, pelos momentos de descontração que passamos juntos, pelas risadas e pelas brincadeiras. Vocês são pessoas especiais.

Agradeço aos meus sobrinhos e sobrinhas, por serem mais um motivo de alegria em minha vida. Vocês são lindos, inteligentes, carinhosos e mais um motivo de orgulho.

Agradeço a cada um que compartilhou o meu post de captação de voluntárias nas redes sociais. Vocês ajudaram a divulgar o meu trabalho e a ampliar o alcance da pesquisa.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

APOIO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular, área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília-DF e foi realizado com recursos parcialmente providos da Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), processo número: 0193.001468/2016. Recurso providos pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPQ), processo número: 440844/2016-9 e processo número: 308344/2016-2. E recursos providos pela MCTIC/FNDCT/CNPq/MECCAPES/MS-Decit, processo número: 440844-2016-9.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XXII
RESUMO	XXIII
ABSTRACT	XXIV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 VÍRUS ZIKA	1
1.1 Epidemiologia	1
1.1.2 DOENÇA- fisiologia da infecção pelo vírus	2
1.2 IMUNOLOGIA DA GESTANTE	3
1.2.1 Citocinas na gestação	5
1.2.2 Particularidades da imunidade inata na gestação	6
1.2.3 Desenvolvimento fetal e gestação ao longo do tempo	7
1.2.4 Inflamação e Infecção pelo vírus Zika na gestação	11
1.3 CITOCINAS	13
1.3.1 Interleucina-1 β	13
1.3.2 Interleucina 2 (IL-2)	14
1.3.3 Interleucina 4 (IL-4)	15
1.3.4 Interleucina 6 (IL-6)	15
1.3.5 Interleucina 10 (IL-10)	16
1.3.6 Interleucina 12p70 (IL-12p70)	17
1.3.7 Interleucina 17A (IL-17A)	18
1.3.8 Interferon-gama (IFN- γ)	19
1.3.9 Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)	19
1.3.10 Interleucina-8 (CXCL8/IL-8)	20
1.3.11 RANTES (CCL5/RANTES)	21
1.3.12 Monocina induzida por Interferon- γ (CXCL9/MIG)	22
1.3.13 Proteína Quimioatraente de Monócitos-1 (CCL2/MCP-1)	22
1.3.14 Interferon- γ induzido pela Proteína-10 (CXCL10/IP-10)	23
1.4 RECEPTORES EM MACRÓFAGOS PARA O TNF E ATIVAÇÃO DA VIA DO NF κ B	24
1.4.1 Vias de sinalização relacionadas a TNFR1	25
1.4.2 Vias de sinalização relacionadas a TNFR2	28
1.4.3 Receptor para LINFOTOXINA (rLTX)	29
1.5 Vias do Fator de transcrição Nuclear kappa B (NF- κ B)	32
1.5.1 A Via canônica do NF κ B	34
1.5.2 A Via não canônica do NF κ B	35
1.5.3 A Via do NF- κ B na gestação	36
1.5.4 A Via do NF- κ B em neurônios/ neuroblastos	37
1.6 DROGAS	40
1.6.1 Atazanavir	40
1.6.2 Lopinavir	41
1.6.3 Curcumina	42
1.7 JUSTIFICATIVA	46

2 OBJETIVOS	48
2.1 Objetivo geral	48
2.2 Objetivos específicos	48
3 Métodos	49
3.1 Delineamento experimental	49
3.2 Tipo de estudo e aspectos éticos	50
3.3 Células estudadas	50
3.3.1 Células C6/36	50
3.3.2 Células Vero	50
3.3.3 Neuroblastoma SK-N-Be (2)	51
3.3.4 Células Mononucleares do sangue periférico	51
3.4 Grupos de estudo	52
3.4.1 Grupos de estudo para avaliação das moléculas da via do NFκB e produção de citocinas pelos neuroblastomas e pelas células mononucleares do sangue periférico	53
3.5 Vírus Zika	55
3.5.1 Titulação	55
3.6 Avaliação da infecção dos neuroblastomas pelo vírus Zika por microscopia eletrônica de transmissão	57
3.7 Tratamento com Atazanavir, Curcumina e Lopinavir	58
3.8 Avaliação da morte do vírus Zika em células C6/36 para determinação de tempo de infecção nos testes	59
3.8.1 Inibição direta do crescimento do vírus Zika pelo atazanavir, curcumina e lopinavir	59
3.9 Cinética de produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes, incubadas com o vírus Zika e tratadas ou não com atazanavir, curcumina e lopinavir	60
3.10 Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão dos receptores para o FNT-α e das moléculas das vias canônica e não canônica do NF-κB nos neuroblastomas e nas células mononucleares do sangue periférico incubadas ou não com o vírus Zika	60
3.11 Avaliação da produção de citocinas e quimiocinas pelos neuroblastomas e pelas células mononucleares do sangue periférico incubadas ou não com o vírus Zika e tratados ou não com atazanavir, curcumina e lopinavir	64
3.12 Estratégias para leitura no citômetro	65
3.13 Análises estatísticas	68
4 RESULTADOS	69
4.1 Inibição direta do crescimento do vírus Zika pelo atazanavir, curcumina e lopinavir	70
4.2 Infecção dos neuroblastomas pelo vírus Zika, avaliado por microscopia eletrônica de transmissão	71
4.3 Receptores para o TNF em Neuroblastoma SK-N-BE (2) e Monócitos do sangue periférico de gestante.	73
4.4 Moléculas da via do NFκB em Neuroblastoma SK-N-BE (2) e Monócitos do sangue periférico de gestante.	83
4.4.1 FADD	83
4.4.2 TRAF	86
4.4.3 Comparação entre as moléculas FADD e TRAF	88

4.4.4 NIK	92
4.4.5 JNK	94
4.4.6 Comparação entre a expressão do NIK e JNK	96
4.4.7 I κ B	100
4.5 MOLÉCULAS FINAIS DA VIA DO NF- κ B EM EM NEUROBLASTOMA SK-N-BE (2) E MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE GESTANTE.	103
4.5.1 relA	103
4.5.2 relB	106
4.5.3 c-Rel	109
4.5.4 p50	110
4.5.5 p52	112
4.5.6 Comparação entre as 5 moléculas finais das vias do NF- κ B	114
4.6 Citocinas Neuroblastoma	119
4.6.1 Interleucina 8 (IL-8)	119
4.6.2 Interleucina 12p70 (IL-12p70)	120
4.6.3 Interleucina 6 (IL- 6)	120
4.6.4 Interferon- γ (IFN- γ)	121
4.6.5 Interleucina 17A (IL- 17A)	121
4.7 Citocinas Mononucleares	122
4.7.1 Interleucina 8 (IL-8)	122
4.7.2 Interleucina 1 β (IL-1 β)	125
4.7.3 Interleucina 6 (IL-6)	127
4.7.4 Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)	129
4.8 Quimiocinas Mononucleares	132
4.8.1 CCL2/MCP-1	132
4.8.2 CCL5/RANTES	134
4.9 Cinética de citocinas em células mononucleares	136
4.9.1 IL-6	137
4.9.2 TNF- α	138
4.9.3 IL-1 β	140
4.9.4 IL-8	142
5 DISCUSSÃO	145
6 CONCLUSÕES	169
7 REFERÊNCIAS	174
8 ANEXOS	184
Anexo 1	184
Anexo 2	184
Anexo 3	185
Anexo 4	186
Anexo 5	186
Anexo 6	187

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – alofiocianina (fluorocromo)

ARNm – ácido ribonucleico mensageiro

CO₂ - gás carbônico

COX-2 – ciclooxigenase 2

COX - ciclooxigenase

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

ERK – cinase reguladora do sinal extracelular

FADD – proteína contendo domínio de morte associado ao FAS

FITC – isotiocianato de fluoresceína (fluorocromo)

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

ICAM-1 – molécula de adesão intercelular 1

IFM – intensidade de fluorescência média

IFN- γ – interferon gama

I κ B – inibidor dos fatores nucleares - κ B (variantes: I κ B α , I κ B κ , I κ B ϵ)

IKK – cinase inibidora da cinase κ B (variantes α , β , δ)

IL – interleucina

iNOS – óxido nítrico sintase indutível

JNK – cinase c-jun N terminal

κ B –kappa B

LPS – lipopolissacarídeo

LTX – linfotoxina (variantes: LT α , LT $\alpha\beta$ e LT β)

MCP-1 – proteína quimiotática para monócitos 1

MAP3K14 – proteína quinase quinase 14 ativada por mitógeno, também conhecida como quinase indutora do NF- κ B (NIK)

MAP – proteína cinase ativadora

MAPK – proteína cinase ativadora de mitógeno

MyD88 – proteína de resposta primária a diferenciação mielóide

NADPH – fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido

NEMO – modulador essencial dos fatores nucleares κ B

NF- κ B – elemento nuclear que se liga aos elementos – κ B no DNA

NIK – cinase indutora do NF κ B

OMS – Organização Mundial da Saúde

p100 – proteína precursora do p52

p105 – proteína precursora do p50

p50 – fator nuclear do NF- κ B p50 (nfkb1)

p52 – fator nuclear do NF- κ B p52 (nfkb2)

PAMP – padrão molecular de patógeno

PE – ficoeritrina (fluorocromo)

PGG2 – prostaglandina G2

PPAR – receptor ativado de proliferação peroxissomal

r1FNT/p55 – receptor 1 do fator de necrose tumoral

r2FNT/p75 – receptor 2 do fator de necrose tumoral

RelA – fator nuclear do NF- κ B p65

RelB – fator nuclear do NF- κ B p68

rTNF- receptor do fator de necrose tumoral

rLT β – receptor beta da linfotoxina

rLTX – receptor para linfotoxina

BSA – soro albumina bovina

STF- salina tamponada com fosfato

STAT – sinal de transdução e ativador da transcrição

Ta1 ou Th1 – linfócitos T auxiliar (CD4+) do ramo de resposta 1

Ta2 ou Th2 – linfócitos T auxiliar (CD4+) do ramo de resposta 2

Tc – linfócito T citolítico

TRAF- fator associado ao receptor de FNT

CMSP- Células Mononucleares do sangue periférico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	10
Alterações no fenótipo e função dos monócitos do primeiro ao terceiro trimestre da gravidez.	
Figura 2	24
O sistema TNF-TNFR1-TNFR2.	
Figura 3	27
Sinalização pelo TNFR1.	
Figura 4	29
Sinalização pelo TNFR2.	
Figura 5	32
A família central do fator de necrose tumoral (TNF) e as vias de sinalização.	
Figura 6	37
Regulação do NF- κ B durante a gravidez.	
Figura 7	41
Efeito sugerido do atazanavir no vírus Zika e na atividade inflamatória.	
Figura 8	49
Desenho experimental.	
Figura 9	56
Diluição seriada para titulação viral.	
Figura 10	56
Esquema da placa com identificação das diluições.	
Figura11	57
Imagem representativa de placa de titulação do vírus Zika.	
Figura 12	66
Histograma- Seleção da população de interesse no gráfico de tamanho (FSC) por complexidade/granulosidade (SSC) dos neuroblastomas.	
Figura 13	67
Histograma- Seleção das células positivas para marcação dos monócitos.	

Figura 14	71
Influência do atazanavir, curcumina e lopinavir na curva de crescimento do vírus Zika.	
Figura 15	72
Avaliação da presença da infecção pelo vírus Zika em neuroblastoma.	
Figura 16	73
Presença da infecção pelo vírus Zika em neuroblastoma.	
Figura 17	76
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor 1 para o Fator de Necrose Tumoral (FNT) no Neuroblastoma SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika.	
Figura 18	76
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor 1 para o Fator de Necrose Tumoral (TNF) monócitos de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika	
Figura 19	77
Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor 1 para o Fator de Necrose Tumoral (TNF) nos monócitos de mulheres não gestantes (NG) <i>versus</i> gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika.	
Figura 20	77
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor 2 para o Fator de Necrose Tumoral (r2TNF) no Neuroblastoma SK-N-BE (2) incubado ou não com o vírus Zika.	
Figura 21	78
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor 2 para o Fator de Necrose Tumoral (TNF) nos monócitos de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika.	
Figura 22	78
Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor 1 para o Fator de Necrose Tumoral (TNF) nos monócitos de mulheres não gestantes (NG) <i>versus</i> gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika.	
Figura 23	79
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor para Linfotóxina (rLTX) no Neuroblastoma SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika	

Figura 24	79
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor para Linfotóxina (rLTX) nos monócitos de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika.	
Figura 25	80
Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor para linfotóxina (rLTX) nos monócitos de não gestantes (NG) <i>versus</i> gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika.	
Figura 26	81
Comparação do efeito da infecção com o vírus zika e do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão dos receptores para o TNF (r1TNF, r2TNF e rLTX) em neuroblastomas, em cada um dos 8 grupos estudados	
Figura 27	82
Comparação do efeito da infecção com o vírus Zika e do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão dos receptores para o TNF (r1TNF, r2TNF e rLTX) em cada grupo estudado em monócitos.	
Figura 28	84
Comparação do efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do FADD, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas infectados ou não com vírus Zika.	
Figura 29	85
Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula FADD avaliada pela Intensidade de Fluorescência Média nos monócitos do sangue periférico incubados ou não com vírus zika.	
Figura 30	85
Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula FADD nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) X gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika.	
Figura 31	86
Comparação do efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula TRAF, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas infectados ou não com vírus zika.	
Figura 32	87
Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula FADD, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos monócitos de mulheres não gestantes (NG) ou gestantes (G).	
Figura 33	87
Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula TRAF nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) X gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika.	

Figura 34	89
Comparação da Intensidade de Fluorescência Média entre os grupos de estudo, na molécula FADD e na molécula TRAF.	
Figura 35	90
Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão das moléculas FADD e TRAF, expressas pela Intensidade de Fluorescência Média, nos neublastomas infectados ou não com vírus Zika.	
Figura 36	91
Comparação da Intensidade de Fluorescência Média das moléculas FADD e TRAF entre as não gestantes e gestantes em cada grupo de estudo.	
Figura 37	92
Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir, na Intensidade de Fluorescência Média das moléculas FADD e TRAF nos monócitos incubados ou não com vírus zika das não gestantes e das gestantes	
Figura 38	93
Comparação do efeito dos 3 tratamentos, atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula NIK, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas infectados ou não com vírus zika.	
Figura 39	93
Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula NIK avaliada pela Intensidade de Fluorescência Média nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas ou não com vírus Zika.	
Figura 40	94
Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula NIK nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) X gestantes (G), infectados ou não com o vírus Zika.	
Figura 41	95
Comparação do efeito dos 3 tratamentos, atazanavir, curcumina e lopinavir, na expressão do JNK, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas infectados ou não com vírus Zika.	
Figura 42	95
Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula JNK, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média, nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas ou não com vírus Zika.	
Figura 43	96

Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula JNK nos monócitos de mulheres não gestantes (NG) X gestantes (G), incubados ou não com o vírus Zika.

Figura 44 97

Comparação da expressão da molécula JNK (A) e da molécula NIK (B), expressa pela Intensidade de Fluorescência Média entre os grupos de estudo.

Figura 45 98

Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão das moléculas JNK versus NIK, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neublastomas infectados ou não com vírus Zika.

Figura 46 99

Comparação da Intensidade de Fluorescência Média das moléculas JNK e NIK entre as não gestantes e gestantes em cada grupo de estudo.

Figura 47 100

Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir, na Intensidade de Fluorescência Média das moléculas JNK e NIK nos monócitos infectados ou não com vírus Zika das não gestantes e das gestantes.

Figura 48 101

Avaliação geral do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na Intensidade de Fluorescência Média da molécula IκB nos neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika.

Figura 49 102

Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão na molécula IκB, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média, nos neuroblastomas incubados ou não com vírus zika.

Figura 50 102

Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula IκB, expressa como Intensidade de Fluorescência Média, nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) infectadas ou não com vírus Zika.

Figura 51 103

Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula IκB nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G), infectadas ou não com o vírus Zika.

Figura 52 104

Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do relA, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika.

Figura 53 105

Comparação do efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula relA, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika.	
Figura 54	105
Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na na expressão da molécula rel A pelos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) infectadas ou não com vírus Zika.	
Figura 55	106
Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula rel A pelos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) versus gestantes (G), incubdas ou não com o vírus Zika.	
Figura 56	107
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula rel B, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika.	
Figura 57	107
Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula NIK avaliada pela Intensidade de Fluorescência Média nas células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas ou não com vírus Zika.	
Figura 58	108
Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula rel B nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) infectadas ou não in vitro com vírus Zika.	
Figura 59	108
Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula rel B nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) versus gestantes (G), incubadas ou não in vitro com o vírus Zika.	
Figura 60	109
Comparação do efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula c-Rel, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados ou não com vírus zika.	
Figura 61	109
Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula c-Rel nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) infectadas ou não in vitro com vírus zika.	
Figura 62	110
Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula c-Rel nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) versus gestantes (G), incubadas ou não in vitro com o vírus Zika.	

Figura 63	110
Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p50, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika.	
Figura 64	111
Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p50 nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas ou não in vitro com vírus Zika.	
Figura 65	112
Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p50 nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) versus gestantes (G), incubadas ou não in vitro com o vírus Zika.	
Figura 66	113
Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p52, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika.	
Figura 67	113
Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p52 nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas ou não in vitro com vírus Zika.	
Figura 68	114
Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p52 nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) versus gestantes (G), incubadas ou não in vitro com o vírus Zika.	
Figura 69	117
Comparação a expressão de relA, relB, c-Rel, p50 e p52, entre os grupos estudados, nos neuroblastomas incubados ou não com o Vírus Zika.	
Figura 70	118
Comparação da expressão das moléculas rel A, rel B, c-Rel, p50 e p52 entre as não gestantes e gestantes em cada grupo de estudo.	
Figura 71	119
Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir, na expressão das moléculas rel A, rel B, c-Rel, p50 e p52 nos monócitos do sangue periférico incubadas ou não com vírus Zika, das não gestantes e das gestantes.	
Figura 72	120
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-8 nos sobrenadantes de cultura de neuroblastoma SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika.	

Figura 73	120
Efeito do tratamento com o Atazanavir, Curcumina e Lopinavir na produção de IL-12p70 nos sobrenadantes de cultura de neuroblastoma SK-N-BE (2) infectados ou não com o vírus Zika.	
Figura 74	121
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-6 nos sobrenadantes de cultura de neuroblastoma SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika.	
Figura 75	121
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de neuroblastoma SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika.	
Figura 76	122
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-17A nos sobrenadantes de cultura de neuroblastoma SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika.	
Figura 77	124
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-8 nos sobrenadantes das culturas dos monócitos de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika.	
Figura 78	125
Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-8 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika.	
Figura 79	126
Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-1 β nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika.	
Figura 80	127
Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-1 β nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubados in vitro ou não com o vírus Zika.	
Figura 81	128
Avaliação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-6 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubados in vitro ou não com o vírus Zika.	
Figura 82	129
Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-6 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika.	

Figura 83	131
Avaliação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika.	
Figura 84	132
Comparação do efeito do tratamento com o Atazanavir, Curcumina e Lopinavir na produção de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue de mulheres Não Gestantes (NG) e Gestantes (G) infectadas in vitro ou não com o vírus Zika.	
Figura 85	133
Avaliação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção da quimiocina MCP-1 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubados in vitro ou não com o vírus Zika.	
Figura 86	134
Comparação do efeito do tratamento com o Atazanavir, Curcumina e Lopinavir na produção de MCP-1 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika.	
Figura 87	135
Avaliação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção da quimiocina RANTES nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika.	
Figura 88	136
Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de RANTES nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika.	
Figura 89	137
Cinética da produção da IL-6 pela incubação com o vírus Zika associado ou não ao tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir em células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika.	
Figura 90	138
Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na cinética da produção de IL-6 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika.	
Figura 91	139
Cinética da produção do TNF- α analisado pela incubação com o vírus Zika associado ou não ao tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir nos sobrenadantes de	

cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika.

Figura 92 140

Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na cinética da produção de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika.

Figura 93 141

Cinética da produção da IL-1 β pela incubação com o vírus Zika associado ou não ao tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis infectadas in vitro com o vírus Zika.

Figura 94 142

Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na cinética da produção de IL-1 β nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis infectadas in vitro com o vírus Zika.

Figura 95 143

Cinética da produção da IL-8 pela incubação com o vírus Zika associado ou não ao tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika.

Figura 96 144

Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na cinética da produção de IL-8 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	67
Parâmetros e voltagens	
Tabela 2	69
Dados antropométricos das mulheres não gestantes e gestantes estudadas	
Tabela 3	69
Resultados dos exames sorológicos das gestantes feitos no acompanhamento pré-natal.	

RESUMO

INTRODUÇÃO: O vírus Zika é um flavivírus que pode causar microcefalia em humanos. O fator de transcrição nuclear NF- κ B regula a inflamação, a sobrevivência celular e a resposta imune, e é ativado pelas vias canônica ou não canônica. O atazanavir, curcumina e lopinavir têm mostrado efeitos moduladores sobre o NF- κ B, podendo interferir na progressão das respostas imunes das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de gestantes e de neuroblastomas (NB). **OBJETIVO:** O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do atazanavir, curcumina e lopinavir nas vias canônica e não canônica do NF- κ B, e a produção de citocinas e quimiocinas em células de NB e em CMSP de gestantes e não gestantes, incubadas *in vitro* com o Zika. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Avaliou-se os efeitos da incubação *in vitro* com o Zika e do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão dos receptores para o TNF (rLTX, r1TNF e r2TNF) e das moléculas da via do NF- κ B em NB e CMSP de não gestantes e gestantes. A produção de citocinas inflamatórias e imunológicas foi quantificada por citometria de fluxo. Os grupos de estudo foram: Controle, incubados com o Zika, tratados com atazanavir, tratados com atazanavir e incubados com o Zika, tratados com curcumina, tratados com curcumina e incubados com o Zika, tratados com lopinavir e tratados com lopinavir e incubados com o Zika. A adsorção do Zika foi feita após 30 min de incubação das células e os tratamentos iniciaram após 1 h de adsorção do vírus, permanecendo em tratamento por 6 h. Foram avaliados os receptores para linfotóxina (rLTX) e receptores para o TNF (r1TNF e r2TNF), as moléculas FADD, TRAF, NIK, JNK, I κ B, p50, p52, p65, relA, relB e c-Rel nas células de NB e monócitos, além das citocinas imunes e inflamatórias: TNF, IFN- γ , IL-12p70, IL-2, IL-10, IL-4, IL-17A, IL-8 e IL-1 nos sobrenadantes das culturas dos NBs e CMSP; e as quimiocinas: CXCL8/IL-8, RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1; CXCL10/IP-10 nos sobrenadantes das culturas das CMSP. As análises foram feitas pelos testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis, ANOVA para medidas repetidas ou Friedman, teste t ou Mann-Whitney, segundo as indicações e significativa para $p < 0,05$. **RESULTADOS:** Observou-se partículas do Zika no citoplasma dos NB por microscopia eletrônica de transmissão. O atazanavir inibiu o crescimento do Zika entre 6 e 24 horas após a incubação, a curcumina reduziu o crescimento do vírus nas primeiras 6 horas após a incubação e o lopinavir reduziu o crescimento do vírus entre os primeiros períodos após a infecção. O NB apresentou constitutivamente no grupo controle maior expressão do rLTX. Nos grupos incubados apenas com o Zika, e os grupos atazanavir+zika, curcumina, curcumina+zika, lopinavir e lopinavir+zika houve maior expressão do r2TNF. Nos monócitos, as não gestantes apresentaram em todos os grupos maior expressão do r1TNF e as gestantes o rLTX. No NB, a molécula FADD foi mais expressa que a molécula TRAF em todos os grupos, sendo c-Rel a de maior expressão das moléculas finais da via. No controle (basal), o NB expressou constitutivamente o rLTX, FADD, NIK, I κ B e c-Rel, com produção de IL-8 e IL-6. Nas não gestantes, o r1TNF foi o de maior expressão e nas gestantes, o rLTX, como também a produção de IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF e as quimiocina MCP-1 e RANTES. Na incubação com o Zika, houve maior expressão do c-Rel nos NBs e menor expressão de relB, com produção aumentada de IL-8 e IL-6. Nas CMSP houve maior expressão do relA em não gestantes, e maior produção de IL-8, TNF, MCP-1 e nas gestantes, maior produção de IL-8, IL-6, TNF e IL1 β . No tratamento com o atazanavir, nos NBs, o c-Rel continuou mais expresso, porém notou-se aumento na expressão da molécula p52, com redução de IL-6, mantendo os níveis de IL-8. Nos monócitos, as não gestantes apresentaram maior expressão da p52, e nas gestantes, maior expressão do relA, com aumento na produção de IL-8. No grupo atazanavir+zika, para os NBs, o c-Rel continuou a ser a molécula mais expressa, porém, houve aumento do p52 e nos monócitos, o relA foi mais expresso nas não gestantes e gestantes, com aumento de IL-8 e IL-1 β . No tratamento com a curcumina, o c-Rel foi mais expresso pelo NB, com aumento da molécula p52 e do relA e redução da IL-6 e IL-8 e nos monócitos, as gestantes e não gestantes expressaram relA. No grupo curcumina+zika, os NBs expressaram o c-Rel, relA e p52 e os monócitos relA, em não gestantes, que aumentaram IL-8 e IL-1 β , e em gestantes, que produziram mais IL-6, IL-8 e IL-1 β . No tratamento com o lopinavir, os NBs expressaram mais c-Rel, com redução de IL-6 e as gestantes continuaram a expressar o relA mais elevado. No grupo lopinavir+zika, os NBs expressaram c-Rel e p52 e nas CMSP, as gestantes aumentaram o relA e IL-8. **CONCLUSÕES:** Confirmamos que o Zika infecta os NBs. O atazanavir, a curcumina e o lopinavir apresentaram uma ação direta reduzindo o crescimento do Zika. A ativação do NF- κ B foi sugestiva da via não canônica nos NB e nos monócitos de gestantes, por expressarem o rLTX, porém as moléculas ativadas juntamente com esse receptor, mostraram um perfil que tende para a via canônica e a incubação com o vírus mostrou que os NBs tendem a uma resposta pelo r2TNF, com perfil canônico. Os monócitos de não gestante expressaram o r1TNF, com ou sem infecção viral, o que sugere uma resposta canônica. As citocinas detectadas e que também sofreram variação têm perfil de ativação canônico. As drogas não afetaram o tipo de resposta, mas atuaram na intensidade responsiva das células. Nossos dados indicam que todas as drogas estudadas foram promissoras e particularmente o atazanavir, que causou uma importante inibição do crescimento do Zika, e deve ser melhor avaliada pela possibilidade de reaproveitamento para o tratamento precoce da infecção pelo Zika, para evitar a microcefalia.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The Zika virus is a flavivirus that can cause microcephaly in humans. The nuclear transcription factor NF- κ B regulates inflammation, cell survival, and immune response, and is activated by canonical or non-canonical pathways. Atazanavir, curcumin, and lopinavir have shown modulatory effects on NF- κ B, which can interfere with the progression of immune responses of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from pregnant women and neuroblastomas (NB). **OBJECTIVE:** The objective of this study was to evaluate the effect of atazanavir, curcumin, and lopinavir on the canonical and non-canonical pathways of NF- κ B, and the production of cytokines and chemokines in NB cells and PBMCs from pregnant and non-pregnant women, incubated in vitro with the Zika virus. **MATERIALS AND METHODS:** The effects of in vitro incubation with Zika and treatment with atazanavir, curcumin, and lopinavir on the expression of TNF receptors (rLTX, r1TNF and r2TNF) and molecules of the NF- κ B pathway in NB and PBMC of pregnant and non-pregnant women were evaluated. The production of inflammatory and immunological cytokines was quantified by flow cytometry. The study groups were: Control, incubated with Zika, treated with atazanavir, treated with atazanavir and incubated with Zika, treated with curcumin, treated with curcumin and incubated with Zika, treated with lopinavir, and treated with lopinavir and incubated with Zika. The adsorption of Zika was performed after 30 min of cell incubation, and treatments began after 1 h of virus adsorption, remaining in treatment for 6 h. The following were evaluated: receptors for lymphotoxin (rLTX) and TNF receptors (r1TNF and r2TNF), FADD, TRAF, NIK, JNK, I κ B, p50, p52, p65 relA, relB, and c-Rel molecules in NB cells and monocytes, as well as immune and inflammatory cytokines: TNF, IFN- γ , IL-12p70, IL-2, IL-10, IL-4, IL-17A, IL-8, and IL-1 in the supernatants of NB and PBMC cultures; and chemokines: CXCL8/IL-8, RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1; CXCL10/IP-10 in the supernatants of PBMC cultures. The analyses were performed by ANOVA or Kruskal-Wallis tests, repeated measures ANOVA or Friedman, t-test or Mann-Whitney, according to the indications and significant for $p < 0.05$. **RESULTS:** Particles of Zika were observed in the cytoplasm of NB by transmission electron microscopy. Atazanavir inhibited the growth of Zika between 6 and 24 h after incubation, curcumin reduced virus growth in the first 6 h after incubation, and lopinavir reduced virus growth between the first periods after infection. NB constitutively presented higher expression of rLTX in the control. In groups incubated only with Zika, and atazanavir+zika, curcumin, curcumin+zika, lopinavir, and lopinavir+zika there was higher expression of r2TNF. In monocytes, non-pregnant women presented higher expression of r1TNF in all groups, and pregnant women presented higher expression of rLTX. In NB, the FADD was more expressed than the TRAF in all groups, with c-Rel being the molecule with the highest expression of the final pathway. In the control (basal), NB constitutively expressed rLTX, FADD, NIK, I κ B, and c-Rel, with production of IL-8 and IL-6. In non-pregnant women, r1TNF had the highest expression, and in pregnant women were rLTX, as well as IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF, and the chemokines MCP-1 and RANTES. In incubation with Zika, there was higher expression of c-Rel in NBs and lower expression of relB, with increased production of IL-8 and IL-6. In PBMC, there was higher expression of relA in non-pregnant women, and higher production of IL-8, TNF, MCP-1, and in pregnant women, higher production of IL-8, IL-6, TNF, and IL1 β . In treatment with atazanavir, in NBs, c-Rel was more expressed, but an increase in the expression of the molecule p52 was noted, with a reduction in IL-6, while maintaining the levels of IL-8. In monocytes, non-pregnant presented higher expression of p52, and pregnant presented higher expression of relA, with an increase in the production of IL-8. In the atazanavir+zika group, for NBs, c-Rel was the most expressed, however, there was an increase in p52 and in monocytes, relA was more expressed in non-pregnant and pregnant, with an increase in IL-8 and IL-1 β . In the treatment with curcumin, c-Rel was more expressed by NB, with an increase in the p52 and relA and a reduction in IL-6 and IL-8, and in monocytes, pregnant and non-pregnant women expressed relA. In the curcumin+Zika group, NBs expressed c-Rel, relA, and p52, and monocytes expressed relA, in non-pregnant women, which increased IL-8 and IL-1 β , and in pregnant women, which produced more IL-6, IL-8, and IL-1 β . In treatment with lopinavir, NBs expressed more c-Rel, with a reduction in IL-6, and pregnant women continued to express the highest relA. In the lopinavir+Zika group, NBs expressed c-Rel and p52, and in CMSP, pregnant women increased relA and IL-8. **CONCLUSIONS:** It was confirmed that Zika virus infects NBs. Atazanavir, curcumin, and lopinavir showed a direct action in reducing Zika growth. The activation of NF- κ B was suggestive of the non-canonical pathway in NB and monocytes of pregnant women, as they expressed rLTX, but the molecules activated along with this receptor showed a profile that tends towards the canonical pathway, and incubation with the virus showed that NBs tend to respond through r2TNF, with a canonical profile. Non-pregnant women's monocytes expressed r1TNF, with or without viral infection, suggesting a canonical response. The detected cytokines that also varied have a canonical activation profile. The drugs did not affect the type of response but acted on the responsive intensity of the responses of the cells. Our data indicate that all the drugs studied were promising, and particularly atazanavir, which caused significant inhibition of Zika virus growth, and it should be better evaluated for the possibility of repurposing for early treatment of Zika infection to avoid microcephaly.

INTRODUÇÃO

1.1 VÍRUS ZIKA

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus de RNA de fita simples, da família *Flaviviridae*, que inclui também os vírus da dengue, do Nilo Ocidental, da febre amarela, da encefalite japonesa e da hepatite C (Mlacker e cols., 2016). O vírus é transmitido, principalmente, pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti*, mas também pode ser transmitido por transfusão de sangue, relações sexuais e vias perianais (Mlacker e cols., 2016).

Em relação aos aspectos imunológicos, O ZIKV aumenta a expressão de genes para a via do interferon e para a resposta cruzada em macrófagos derivados de células mielóides, aumenta a expressão de CD80 e CD86 e aumenta a produção de IL-6, MCP-1 e IP-10 por células de Hofbauer (HBC). Tem como alvo os receptores FcR, TLR4 e DC-SIGN na placenta e em macrófagos (True e cols., 2022). Os monócitos sanguíneos e macrófagos teciduais demonstraram ser um alvo celular favorável para vários patógenos conhecidos por serem transmitidos verticalmente, como o ZIKV (True e cols., 2022).

Na gestação, as células imunes inatas na interface materno-fetal fornecem a primeira linha de defesa contra a transmissão vertical de patógenos virais (True e cols., 2022). O ZIKV é conhecido por sua capacidade de superar os mecanismos de defesa intrínsecos da placenta, permitindo que ele atinja 10% dos fetos em desenvolvimento resultando em defeitos congênitos adversos, como a microcefalia. Os monócitos CD14⁺ CD16⁺ são o principal alvo da infecção pelo vírus. O ZIKV infecta HBCs e trofoblastos coriônicos (CTBs) usando como receptores para entrada nas células o Axl, Tyro3 e TIM1. Tem sido sugerido que a infecção in vitro pelo ZIKV de HBC é aumentada pela presença de IgG de exposição anterior ao flavivírus por meio do aumento dependente de anticorpos (ADE) (True e cols., 2022).

1.1.1 Epidemiologia

O ZIKV é atualmente um dos vírus emergente mais importante do mundo devido à gravidade das suas complicações (Zanluca e cols, 2016). A infecção pelo ZIKV, depois de quase 60 anos de sua descrição inicial, foi e tem sido motivo de preocupação mundial após a epidemia detectada no Brasil, principalmente pelo potencial associado de ocorrência de microcefalia, quando a infecção ocorre em gestantes, e pelo risco de evolução para a síndrome de Guillain-Barré, complicações mais graves do quadro da

Febre do ZIKV (Driggers e cols, 2016; MS, 2016). O vírus foi inicialmente descrito na década de 40, mas desde seu reaparecimento em 2007 até março de 2016, já foram descritos casos autóctones em 52 países e territórios, principalmente nas Américas (Petersen e cols, 2016; Broutet e cols 2016).

Em março de 2015, esse vírus foi identificado no Brasil, quando uma epidemia de doenças exantemática ocorreu na Bahia (Campos e cols, 2015; Petersen e cols, 2016), e foi confirmada a transmissão autóctone de febre pelo ZIKV a partir de abril de 2015. Foram também confirmados laboratorialmente óbitos pela infecção pelo ZIKV e número elevado de crianças que desenvolveram microcefalia e quadros da síndrome de Guillain-Barré.

De acordo com o boletim epidemiológico (BE) 5 de 2023, no Brasil, ocorreram 1857 casos confirmados para a síndrome congênita associada ao ZIKV, segundo classificação final e atenção à saúde, de 2015 até 2022. A análise da taxa de incidência de casos confirmados segundo regiões geográficas demonstra que a região Nordeste apresentou 1413 casos, correspondendo a 76,1% dos casos e a região Centro Oeste teve 137 casos, correspondendo a 7,4% do total no país.

De acordo com o BE 24 do Distrito Federal (DF), até a semana epidemiológica (SE) 26 de 2023, foram notificados 44 casos suspeitos de doença aguda pelo ZIKV, sendo 2 deles prováveis e em investigação. Estudos mostraram que a prevalência de casos de microcefalia na América do Sul está relacionada à infecção materna pelo ZIKV na gravidez, especialmente nos dois primeiros trimestres da gestação (Antonίου e cols., 2020). O número elevado de casos de microcefalia é um tremendo desafio para o Sistema Único de Saúde brasileiro atualmente e em longo prazo. Portanto, são necessárias medidas para melhor compreensão dos fenômenos fisiopatológicos determinantes da doença e de suas complicações e a avaliação de possíveis drogas com potencial para diminuir as complicações da infecção por esse vírus.

1.1.2 DOENÇA- fisiopatologia da infecção pelo vírus

A fisiopatologia da infecção pelo ZIKV está associada a uma resposta imune desregulada. O vírus tem tropismo por células neurais. Estudos sugerem que o ZIKV pode levar à morte de células neurais imaturas, levando a um desenvolvimento anormal do cérebro do feto em desenvolvimento (Cugola e cols., 2016).

A microcefalia, uma das complicações da infecção, é um distúrbio do desenvolvimento neuronal, que tem como fenótipo a redução acentuada no tamanho do

cérebro e deficiência intelectual causada pela proliferação celular prejudicada e pela morte de células progenitoras corticais e sua progênie neuronal (Wen e cols., 2017).

As gestantes são vulneráveis a infecções virais durante o primeiro e segundo trimestres, quando há um risco elevado de dano congênito ao feto, podendo levar ao aborto espontâneo, restrição de crescimento intrauterino e microcefalia no recém-nascido, que resulta da capacidade do ZIKV de infectar células da placenta e precursores neurais no feto. As crianças nascidas de mulheres infectadas durante a gravidez apresentaram defeitos congênitos, e há evidências de complicações relacionadas ao ZIKV que podem levar ao que é conhecido como síndrome congênita do Zika (SCZ). Essas malformações congênitas, que incluem atrofia cortical com microcefalia e prejuízos funcionais como disfagia e epilepsia, podem ocorrer após infecção sintomática ou assintomática (Giraldo e cols., 2023).

O ZIKV também tem sido associado à síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune que afeta o sistema nervoso periférico. A infecção viral desencadeia uma resposta autoimune no organismo, na qual o sistema imunológico ataca erroneamente as células neurais periféricas, resultando em injúria dos nervos e sintomas neurológicos (Weaver e cols., 2016).

Outra característica fisiopatológica importante da infecção pelo ZIKV é a ativação do sistema complemento, que é parte do sistema imunológico responsável por combater microorganismos invasores e sua ativação excessiva pode causar inflamação e danos aos tecidos, contribuindo para os efeitos patológicos observados na infecção pelo vírus Zika (Schiela e cols., 2018).

1.2 IMUNOLOGIA DA GESTANTE

O sistema imunológico é um sistema de defesa do hospedeiro que combina múltiplos mecanismos para proteger o organismo de vários patógenos e do desenvolvimento de doenças. O sistema imune é composto pela imunidade inata e pela imunidade adaptativa ou adquirida, e cada um deles incluindo um componente celular e um humoral (Luppi e cols., 2003).

No período gestacional, o feto que se desenvolve dentro do útero não é rejeitado pelo sistema imunológico materno e o que permite essa tolerância concomitante à defesa contra patógenos são as modificações que ocorrem no sistema imunológico materno durante a gestação (Luppi e cols., 2003).

A gestação humana requer ajustes imunológicos que aparentemente podem ser classificados como incompatíveis, o que leva a questão de como o feto suprime as respostas de rejeição do sistema imune materno e mantém ou mesmo aumenta a resistência da gestante às infecções (Sacks e cols., 1999).

O estabelecimento e manutenção de uma gestação bem-sucedida envolvem um estado de tolerância imunológica seletiva, imunossupressão e imunomodulação na presença de uma forte imunidade antimicrobiana e esta falta de reatividade imune materna em relação ao feto estão ligadas à redução do número de células T citotóxicas (CD8+) nesse período (Sacks e cols., 1999).

A implantação do embrião e a placentação precoce são importantes, pois a mulher sofre várias alterações fisiológicas anteriores à implantação do blastocisto, eventos esses que são imediatamente contrabalançados por um estado de tolerância, bem amplo e complexo, que é induzido por fatores fetais e hormônios e que inclui o recrutamento e a proliferação de diferentes tipos celulares imunorreguladores e a expressão de várias moléculas reguladoras, permanecendo nessa fase até a indução do parto (Förger, 2020). No parto, há o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, o que caracteriza-se como um mecanismo pró-inflamatório (Förger e cols., 2020).

Como na gestação o sistema imune inato está ativado e o adaptativo suprimido, os monócitos e granulócitos, pelas mudanças nos fenótipos e funções, demonstram serem as células mais afetadas nesse período e as células T estão reguladas negativamente para manter a integridade fetal, fato crucial para a tolerância aos aloantígenos paternos, que são altamente imunogênicos (Luppi e cols., 2003).

Ocorre resposta normal às vacinas administradas nas gestantes quanto a sua efetividade, já que a produção de anticorpos não está comprometida, sugerindo que o sistema imunológico materno, quando ativado, tem maior probabilidade de responder com anticorpos e menor capacidade de responder com células T ativadas (Luppi e cols., 2003). As células T das gestantes têm comprometida a proliferação e secreção de IL-2 e IFN- γ e redução da síntese de IL-6. E já para as células B, as funções são mantidas e a produção de anticorpos é normal (Luppi e cols., 2003).

Na gravidez ocorre a mudança do perfil Th1 para Th2, seguida por uma mudança "rebote" para Th1, caracterizado pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias, IL-2, TNF- α , TNF- β e IFN- γ , no período do parto. As citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5, IL-6, IL10 e IL-13, que são do perfil Th2, fortalecem a imunidade humoral, suprimindo as respostas imunes mediadas por células que prejudicam o feto (Tsoli e cols., 2000).

Uma das funções dos monócitos/macrófagos (M1) na infecção é a apresentação de antígeno para as células T e esses monócitos/macrófagos podem ser do tipo M1 ou M2. Os do tipo M1 podem estar envolvidos na apresentação de antígenos e também podem ser ativados por adjuvantes, como por exemplo, a endotoxina para produzir moléculas de superfície coestimulatórias ou citocinas pró-inflamatórias (Sacks e cols., 1999). Os sinais enviados pelos macrófagos M1 e M2 são estimuladores de células T, para se tornarem linfócitos Th1 ou Th2 efetores e pela liberação de citocinas, os monócitos ativados irão ativar outros monócitos (M3), e outras células do sistema imune inato, como células citotóxicas naturais (NK) e granulócitos. Durante o período gestacional, a unidade feto-placentária previne a apresentação de antígenos pela ausência de antígenos do CPH de classe I (HLA-A e HLA-B) nas células dos trofoblastos (Sacks e cols., 1999).

Partículas de células fetais ou placentárias eliminadas ou mesmo produtos hormonais da placenta também ativam os monócitos e conseqüentemente outras células inatas, com exceções das células NK que parecem estar especificamente inibidas (Sacks e cols., 1999).

A supressão da atividade das células T durante a gestação deixa a mãe vulnerável a infecções virais, todavia ocorre aumento considerável de células NK na interface materno-fetal, que são protetoras contra vírus e possivelmente contra bactérias e parasitas, impedindo que os patógenos cheguem ao feto (Wu e cols., 2020)

A regulação das vias do NF- κ B é fundamental para a manutenção da gravidez, sendo essencial o controle de seus níveis para a prevenção do trabalho de parto prematuro, embora o mecanismo exato de regulação dessas vias ainda não tenha sido estabelecido, mas sua atividade deve permanecer suprimida durante a maior parte do tempo normal da gestação até o final, para evitar o parto prematuro (Gómez-Chávez e cols., 2021).

1.2.1 Citocinas na gestação

Na gestação, a quantidade elevada de hormônios como a progesterona (P4), podem suprimir a atividade do NF- κ B e as citocinas, como IL-10, que é expressa por um longo período da gravidez, têm um papel vital na regulação negativa do NF- κ B na interface materno-fetal e sistemicamente. Ela atua regulando negativamente o TNF- α , a IL-6 e as prostaglandinas em membranas fetais humanas e células decíduais e sua ausência resulta em aumento da expressão de IL-6 e TNF- α induzida por LPS, causando o parto prematuro (Gómez-Chávez, 2021).

O TNF é uma citocina multifuncional que já foi identificada na placenta e expressa em tecidos embrionários e participa da organogênese embrionária. É um potente ativador de apoptose, mas regula também a cascata anti-apoptótica, como também tem função regulatória na proliferação celular. O TNF- α pode sinalizar para induzir a morte do embrião, se os eventos lesivos estimularem dano que poderá culminar em anomalias estruturais, entretanto, poderá induzir mecanismos protetores, se o reparo do dano puder evitar o desenvolvimento inadequado (Toder e cols, 2003).

Há na literatura estudos que mostram que na fase aguda da infecção pelo ZIKV ocorre aumento das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-6. Também se observou aumento na produção de IL-2 e de citocinas de vários perfis da resposta imune, como citocinas do perfil T auxiliar do tipo 2 (IL-4 e IL-13), citocinas do perfil T auxiliar 17 (IL-17), citocinas do perfil T auxiliar 9 (IL-9), e regulatórias (IL-10). Os níveis da maioria dessas citocinas permaneceram elevados na fase de recuperação.

1.2.2 Particularidades da imunidade inata na gestação

Na gestação há uma desregulação única entre os braços inatos e específicos do sistema imunológico materno, em que os monócitos, ao invés dos linfócitos, assumem um papel central na adaptação imunológica materna. Os componentes do sistema imunológico inato materno estão ativados sistemicamente, e ocorre aumento do número de monócitos e granulócitos ativados, a partir do primeiro trimestre. Outros mostraram aumento da fagocitose por monócitos e da atividade da explosão respiratória. Há aumento da expressão do receptor para endotoxina CD14 na superfície dos monócitos e eles produzem mais a citocina pró-inflamatória IL-12 (Sacks e cols., 1999). Foi mostrada a ativação de granulócitos na gravidez e alterações nos níveis plasmáticos de fatores inatos solúveis típicos de uma resposta de fase aguda. A atividade citotóxica e a produção de interferon- γ (IFN- γ) pelas células NK estão suprimidas (Sacks e cols., 1999).

Produtos solúveis da placenta na circulação materna podem ter efeitos supressores sobre a função dos linfócitos, mas podem ativar monócitos. Além disso, células inteiras de origem fetal ou trofoblástica são transportadas para o sangue materno e vesículas de microvilosidades sinciciotrofoblásticas podem ser detectadas na circulação periférica. Como a defesa inata materna está ativada na gestação e a adaptativa suprimida, ela pode assumir um papel importante na defesa imunológica materna geral, mas sua ativação

exacerbada pode levar a apresentações clínicas mais graves em algumas infecções (Sacks, 1999).

O sistema imune apresenta uma atividade bem orquestrada para garantir o sucesso da gestação, sendo o primeiro trimestre caracterizado por um grande aumento na atividade imune inata, promovendo a implantação bem-sucedida do blastocisto e o desenvolvimento da placenta, sendo esse período o de maior vulnerabilidade a patógenos transmitidos verticalmente, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), ZIKV, SARS-CoV-2 e outros. Já na progressão para o segundo trimestre ocorre o estabelecimento de um ambiente imunossupressor que promove a tolerância e o crescimento fetal, evitando o nascimento prematuro, o aborto espontâneo e outras complicações gestacionais. No terceiro trimestre é estabelecido um ambiente inflamatório que desencadeia o parto. Os monócitos na circulação materna e os macrófagos residentes nos tecidos na interface materno-fetal desempenham um papel crítico neste delicado equilíbrio (True e cols., 2022).

A imunidade inata fornece um mecanismo de defesa rápido contra desafios microbianos e promove o reparo tecidual, enquanto a imunidade adaptativa faz reconhecimento altamente preciso do patógeno, implantação de mecanismos efetores antimicrobianos robustos para remover o patógeno e estabelecimento da memória imunológica. Células imunes inatas da linhagem mieloide, principalmente monócitos, macrófagos e células dendríticas (DC), reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) por meio de receptores de reconhecimento de padrão (PRR), iniciando assim vias de sinalização imune que culminam na produção de mediadores imunológicos que aumentam a permeabilidade vascular, recrutam células imunes adicionais e eliminam patógenos por meio da fagocitose (True e cols., 2022).

As células imunes mielóides desempenham um papel crítico na implantação, proteção contra infecções diante de respostas imunes adaptativas amortecidas e, na promoção do trabalho de parto e do próprio parto (True e cols., 2022).

1.2.3 Desenvolvimento fetal e gestação ao longo do tempo

Durante o desenvolvimento fetal encontramos monócitos e macrófagos em locais distintos, começando com o saco vitelino, fígado fetal e terminando com a hemopoiese na medula óssea. A primeira geração de células hematopoiéticas ocorre dentro da parede do saco vitelino e origina eritrócitos, megacariócitos e macrófagos residentes nos tecidos (True, 2022).

O desenvolvimento de um sistema circulatório permite que células-tronco hematopoiéticas (CTH) imaturas migrem da região aorta-gônada-mesonefro do mesoderma embrionário para o fígado fetal, local da segunda maior onda hematopoiética para o sistema imunológico em desenvolvimento. As CTHs geradas na medula óssea, no meio da gestação, não são totalmente funcionais até após o nascimento, quando a medula óssea se torna o local primário da hematopoiese, sendo até esse momento, o fígado e o baço fetais a primeira fonte de suprimento de monócitos. A hematopoiese definitiva das CTHs ocorre na medula óssea e resulta no desenvolvimento de monócitos por meio de unidades formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CFUs), unidades formadoras de colônias de monócitos (M-CFUs), monoblastos e promonócitos (True, 2022).

Os monócitos clássicos (CD14⁺ CD16) desempenham papel fundamental no combate aos patógenos por meio da fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção de citocinas em resposta à ativação PRR. Alternativamente, o subconjunto de monócitos não clássicos (CD14^{dim} CD16⁺) desempenha um papel menor na fagocitose, mas é um produtor eficiente de citocinas. A ativação de monócitos por meio da sinalização via família toll-like receptor (TLR) resulta na ativação do fator de diferenciação mieloide da proteína adaptadora 88 (MyD88). A via dependente de MyD88 ativa ainda mais o NF- κ B, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α . Os monócitos também podem detectar patógenos intracelulares por meio de PRRs intracelulares, como receptores do tipo retinóico (RLR), principalmente helicases citoplasmáticas RIG-1 e MDA-5. Os monócitos circulantes migram para os tecidos em resposta a fatores de crescimento locais, citocinas pró-inflamatórias e produtos microbianos para se diferenciarem em macrófagos (True e cols., 2022).

Os macrófagos na interface materno-fetal são cruciais na tolerância fetal, na preparação dos tecidos cervicais, no parto, no reparo tecidual pós-parto e exibem capacidade de auto-renovação. Os macrófagos no estroma endometrial, quando estimulados pela introdução de antígenos do fluido seminal, provocam uma resposta inflamatória caracterizada pela regulação positiva do TNF- α e IL-1 β , que desempenham papel fundamental na implantação (True e cols., 2022).

O sangue periférico fornece um compartimento acessível para avaliar as adaptações cronológicas de adaptações imunes precisamente cronometradas ao longo da gravidez (True, 2022). O aumento dependente da idade gestacional na resposta STAT1

foi identificado em monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos (mDCs), que se correlacionou com a resposta aumentada de células NK e monócitos a desafios virais durante a gravidez (True, 2022).

A análise do plasma coletado do primeiro (T1) ao terceiro trimestre (T3) de gestação permitiu a identificação de proteínas que marcam com precisão a idade gestacional, notadamente, glicopiana 3, hormônio coriônico somatomamotropina (HCS) e granulinas. O HCS se correlaciona fortemente com a atividade JAK/STAT nas células T CD4⁺, destacando como o processo de sinalização celular mais promissor para prever a idade gestacional. Também estão aumentados na circulação materna as formas solúveis de receptores de superfície celular, como o receptor do fator 1 estimulador de colônias (CSF1R) e o receptor de imunoglobulina polimérica (PIGR), que não tem função clara, mas essas proteínas na circulação podem indicar aumento da expressão e descamação da superfície celular. O CSF1 é mais expresso no 15º dia de gestação e diminui ao longo do tempo e ele é crítico para a produção, diferenciação e função dos macrófagos, já o seu receptor, CSF1R, é importante para a função normal dos macrófagos e é expresso por todos os fagócitos mononucleares encontrados no útero grávido e sua expressão é contínua na gestação, tendo seu pico no parto e na recuperação pós-parto (True e cols., 2022).

A gravidez é marcada pelo aumento progressivo na ativação de monócitos, com fenótipos alterados caracterizados pela regulação positiva dos marcadores de ativação celular CD11b e CD14 e pela produção de radicais livres de oxigênio e citocinas e com expressão aumentada de HLA-DR, CD11a, CD49d, CD64 e CD54. A comparação de transcriptomas de monócitos T1 e T3 mostrou aumento da expressão de moléculas do MHC (*B2M* e *HLA-DRA*) e genes pró-inflamatórios (*VCAN*, *LYZ*) no final da gravidez. Além disso, os níveis plasmáticos de CD14 solúvel (sCD14), um marcador para a ativação de monócitos *in vivo*, aumentaram entre T1 e T3. A secreção de citocinas (TNF- α e IL-6) pelos monócitos circulantes em resposta à estimulação por LPS também é aumentada à medida que a gravidez progride. Além da hiperresponsividade à estimulação de TLR4 por LPS (ligante de TLR4), a indução de marcadores de ativação CD40, CD86, CD80 e CD83, em monócitos T3 é significativamente maior em relação aos monócitos T1. O perfil das respostas transcricionais à estimulação por LPS mostrou um aumento no número de genes expressos diferentemente (GED) entre T1 e T3. No T3, o número de GEDs regulados pelos fatores de transcrição IRF1, STAT1 e STAT3 aumentaram, e o aumento de GEDs mostrou maior proporção no mapeamento de monócitos em termos de

ontologia gênica (OG) através do enriquecimento funcional e no mapeamento de associados à ativação mielóide, adesão de leucócitos e sinalização de citocinas em linha com a resposta anti-LPS aumentada. A ativação aumentada de monócitos e as respostas inflamatórias à estimulação pelo TLR são acompanhadas por acessibilidade aumentada da cromatina entre T1 e T3 (Figura 1) (True, 2022).

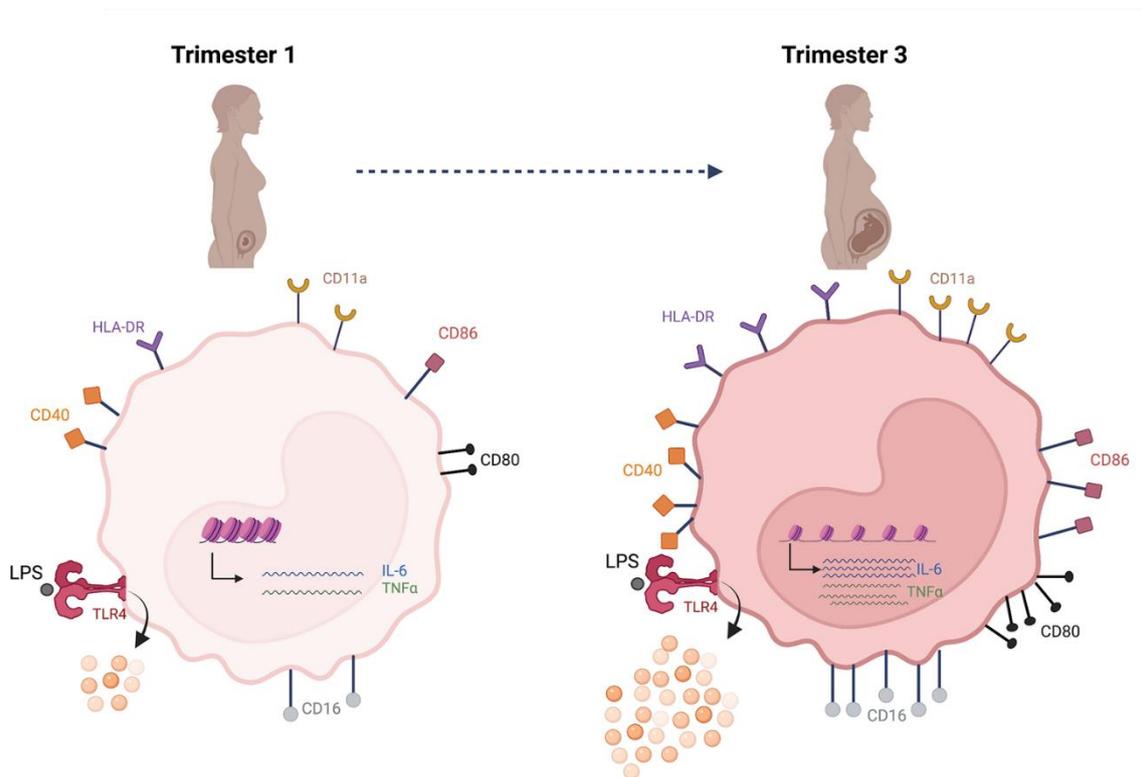


Figura 1- Alterações no fenótipo e função dos monócitos do primeiro ao terceiro trimestre da gravidez (Fonte: True e cols., 2022).

Micropartículas de membrana de sinciotrofoblastos derivados da placenta são liberadas no sangue materno e estimulam respostas inflamatórias maternas por meio de monócitos, que secretam citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-8), intensificam a atividade fagocítica e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). O T3 é caracterizado por aumento significativo nos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-2, IFN- β , IL-7, IL-17A, IL-18, IL-23), citocinas reguladoras (IL-4, IL-10 e IL-13) e quimiocinas (CCL3, CXCL9 e CXCL11), dos níveis plasmáticos de IL-27, um ativador pró-inflamatório de células mielóides e um membro da família IL-12 (True e cols., 2022).

Os interferons tipo I e o TNF podem reprogramar cooperativamente o epigenoma de células mielóides, resultando em maior acessibilidade à cromatina em loci

inflamatórios e estabelecimento de memória transcricional no nível da cromatina, o que aumenta drasticamente os níveis plasmáticos dessas citocinas e com a gravidez pode explicar a remodelação da cromatina nos monócitos, levando a respostas aumentadas ao LPS e aos ligantes virais (True, 2022).

O trabalho de parto ativo é caracterizado por sinais de inflamação aumentada na circulação materna, incluindo sinalização STAT3 em monócitos clássicos. O STAT3 sinaliza a migração celular para as membranas fetais durante o parto, interferindo na capacidade de resposta da progesterona, ele é ativado por citocinas pró e anti-inflamatórias, incluindo IL-6, IFNs, TNF- α e IL-10 e provavelmente contribui para promover o parto como o alvo a jusante da IL-6, conhecido por iniciar o trabalho de parto. A IL-6 também é importante para a estimulação da migração de monócitos e células T para as membranas deciduais na interface materno-fetal, promovendo a inflamação e o parto (True e cols., 2022).

As concentrações de hormônios metabólicos, como leptina e insulina, e diversas adipocinas, aumentam na circulação sanguínea materna durante a gravidez saudável. A leptina utiliza a IL-6, via STAT3 e NF- κ B, para aumentar os níveis de citocinas inflamatórias e marcadores de ativação (True e cols., 2022).

A placenta é o principal órgão de apoio ao desenvolvimento fetal e, em vez de atuar como uma barreira, fornece uma rede de comunicação entre a mãe e o feto. Ela é um órgão único e altamente especializado, composto por compartimentos de tecido materno e fetal definido como decídua e vilosidades coriônicas, respectivamente. Este órgão temporário é essencial para o crescimento e desenvolvimento fetal saudável. Células especializadas chamadas trofoblastos medeiam a rede de comunicação entre o feto e a mãe. O sucesso da implantação depende da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e IL-8 por células endometriais epiteliais e estromais (True e cols., 2022).

1.2.4 Inflamação pelo vírus Zika na gestação

A inflamação durante o desenvolvimento pré-natal pode ser prejudicial aos processos de neurodesenvolvimento, aumentando o risco de distúrbios neuropsiquiátricos. A exposição pré-natal à infecção viral materna durante a gravidez é um importante fator de risco ambiental para a manifestação desses distúrbios (Otero, 2022)

O cérebro fetal imaturo é especialmente vulnerável à lesão de ativação imune materna (AIM) em parte porque o neurodesenvolvimento homeostático depende de moléculas de sinalização imune inata, incluindo citocinas inflamatórias (Otero, 2022).

O equilíbrio de citocinas interrompido no período de desenvolvimento fetal pode impactar negativamente no desenvolvimento do cérebro fetal. Embora os tecidos da interface materno-fetal sirvam como barreiras físicas e imunológicas contra a transmissão vertical de patógenos, a inflamação materna ainda pode levar a um desenvolvimento adverso ou retardado da prole (Otero, 2022).

Na pesquisa sobre a ativação imune materna (AIM), o aumento da citocina inflamatória IL-6 circulante induzido por mimético viral inicia uma cascata inflamatória dentro do compartimento fetal devido à ligação da citocina a receptores na placenta, levando a neuropatologia e comportamento anormais e nesses mesmos aspectos, o aumento da produção de IL-17A pelos linfócitos T auxiliares (células Th17) na circulação materna resulta em malformações corticais fetais e comportamentos aberrantes, apontando essas citocinas como fatores primários, causadores de anormalidades do neurodesenvolvimento (Otero, 2022).

Esses dados mostram que é pertinente a avaliação das funções dos monócitos do sangue periférico maternos para uma melhor compreensão dos fenômenos fisiopatogênicos envolvidos nas possíveis alterações que possam ocorrer na gestante e no feto na vigência de possíveis infecções durante a gravidez (Otero, 2022).

Os monócitos CD14⁺CD16⁺ são o principal alvo da infecção pelo ZIKV, que também é capaz de se replicar dentro dos macrófagos por meio dos receptores FcR, TLR4 e DC-SIGN. O ZIKV infecta células-tronco hematopoiéticas (CTH) e trofoblastos coriônicos (CTBs) usando como cofatores de entrada o Axl, Tyro3 e TIMI (True, 2022).

Tem sido sugerido que a infecção de CTHs, *in vitro*, pelo ZIKV, é aumentada por IgG de exposição anterior ao flavivírus por meio do aumento dependente de anticorpos (ADE) e essa infecção é intensificada pela hiperplasia e proliferação dessas células, amplificando assim a gama de alvos potenciais. Durante a hiperplasia de CTH secundária à infecção pelo ZIKV, uma frequência maior de macrófagos ativados alternativamente está presente e ela persiste ao longo do segundo e terceiro trimestres conforme indicado por análises histológicas com marcação de CD68 ou CD163 (True, 2022).

A infecção pelo ZIKV de CTH leva à produção de IFN tipo 1, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (como IL-6, MCP-1 e IP-10), provocando inflamação

maciça e dano tecidual causando insuficiência placentária. Células Hofbauer (HBC) isoladas de placenta a termo infectada pelo ZIKV *in vitro* apresentam um fenótipo ativado, aumentando a expressão superficial de CD80 e CD86 e secreção de mediadores inflamatórios. O ZIKV controla o maquinário das células da placenta para construir replicação de novos vírions (True, 2022).

1.3 CITOCINAS

1.3.1 Interleucina-1 β (IL-1 β)

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória que atua como um pirogênio endógeno, estimulando a proliferação celular, diferenciação e função de diversas células imunocompetentes inatas e adaptativas, mediando o início de doenças inflamatórias e potencializando as respostas imunes e inflamatórias. Essa citocina é composta por 2 proteínas principais, IL-1 α e IL-1 β , que possuem propriedades biológicas semelhantes, mas com diferenças pontuais em sua localização, maturação e secreção (Akdis, 2011).

A IL-1 α é traduzida em uma forma biologicamente ativa, enquanto a IL-1 β é traduzida como pró-IL-1 β e não tem atividade biológica até ser processada pela caspase-1. IL-1 α e IL-1 β exercem efeitos semelhantes ao se ligarem ao receptor de IL-1 tipo I (IL-1RI). Eles também podem se ligar ao receptor de IL-1 tipo II (IL-1RII), que atua como um receptor chamariz e não está envolvido na transdução de sinal (Akdis, 2011).

Os macrófagos, monócitos, linfócitos, ceratinócitos, micróglia, megacariócitos, neutrófilos, fibroblastos e células de revestimento sinovial produzem IL-1 e um dos seus receptores. O IL-1RI é expresso em todas as células que respondem a IL-1 α e β , que incluem as células T, fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais, e é frequentemente co-expresso com o receptor IL-1RII (Akdis, 2011).

Os precursores de IL-1 β são produzidos a partir da ativação celular, podendo ser por meio dos TLRs, ligado a membrana, por seu agonista, como endotoxinas ou LPS. A pro-IL-1 β não tem atividade biológica até ser processada e para a geração de sua forma madura de 17 kd, é necessária uma etapa proteolítica. Nesse processamento intracelular necessita-se da enzima conversora de IL-1 β , também conhecida como caspase-1, que faz parte de um complexo de proteínas intracelulares chamados inflamassoma. Nas células em repouso, a pró-caspase-1 está ligada a um inibidor molecular, impedindo sua ativação. No início da síntese da IL-1 β , ocorre a ativação da caspase-1 ocorrendo o processamento do precursor de IL-1 β em uma forma madura pronta para secreção (Akdis, 2011).

A caspase-8 também induz o processamento da IL-1 β madura em resposta à estimulação pelos TLR3 e TLR4. A IL-1 β madura permanece dispersa no citosol até que um segundo estímulo impulse o processamento e a liberação da forma ativa (Akdis, 2011).

A diferenciação dos linfócitos para o ramo Th17 é regulada pela expressão diferencial de IL-1RI, que é controlada pelas IL-7 e IL-15. A importância de IL-1 β para a indução de IL-17 também foi demonstrada em células T, que produzem IL-17 após estimulação com IL-1 β combinada com IL-23. A IL-17 tem um papel fundamental em doenças autoimunes, como artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico e outros, bem como em alergia e asma (Akdis, 2011).

A IL-1 β induz a síntese de quimiocinas, como IL-8, potente quimioatratante de neutrófilos, que podem aumentar a inflamação por meio de citocinas pró-inflamatórias e liberação de enzimas dos grânulos dos neutrófilos, que estão envolvidas no dano tecidual. Macrófagos e monócitos ativados produzem IL-1 α e β , que desempenham um papel importante na coordenação da inflamação local e sistêmica, causando inflamação e induzindo a expressão de outros genes pró-inflamatórios, como do COX tipo II, o óxido nítrico sintase induzível e outras citocinas e quimiocinas (Akdis, 2011).

Dentre as ações da IL-1 β , é importante destacar a ativação do endotélio vascular local, ocasionando vasodilatação, resultando em aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e por consequência ocorrendo o recrutamento de proteínas séricas e leucócitos para o local da infecção. Ela também estimula hepatócitos para produzirem proteínas de fase aguda, importantes para opsonização de patógenos para fagocitose por macrófagos e neutrófilos e como indutor chave de proteínas antimicrobianas, como a β -defensina, que defende a mucosa nos pulmões durante o primeiro contato com o patógeno (Akdis, 2011).

1.3.2 Interleucina 2 (IL-2)

As principais células produtoras de IL-2 são os linfócitos, destacando as células T CD4 auxiliar do tipo 1 e CD8, e em menor escala as células dendríticas ativadas e as NK e NK T (NKT). Na ativação de células T, a produção e expressão do receptor para a IL-2 (IL-2Ra) é rapidamente induzido e participa da formação de um complexo quaternário de alta afinidade, que ativa múltiplas vias de transdução de sinal e induz a proliferação da própria célula que produziu a IL-2 e o rIL-2 (Akdis, 2011).

Estudos mostram o aumento progressivo da sinalização STAT5ab dependente de IL-2 em vários subconjuntos de células T, incluindo células T de memória CD4⁺ e CD8⁺, células T $\gamma\delta$ e células T CD25⁺ reguladoras ao longo da gravidez (True, 2022).

1.3.3 Interleucina 4 (IL-4)

A IL-4 é produzida pelas células Th2, basófilos, mastócitos e eosinófilos e corresponde a um monômero de 15 kd (129 aminoácidos). Há dois tipos de receptores para a IL-4, um que se liga apenas a IL-4 e consiste em 2 cadeias de receptores: IL-4Ra (CD124) e o gama comum (γc) (CD132). O IL-4R tipo II liga-se a IL-4 e IL-13 e consiste nas cadeias IL-4Ra e IL-13Ra1. A citocina pleiotrópica IL-4 regula condições alérgicas e a resposta imune protetora contra helmintos e outros parasitas extracelulares (Akdis, 2011).

A IL-4 é o principal estímulo para o desenvolvimento das células Th2, também suprime o desenvolvimento de células Th1 e induz a formação de imunoglobulinas da classe IgE em células B. A IL-4 aumenta a expressão de moléculas do MHC de classe II em células B, regula positivamente os receptores de células B, aumenta a expressão de CD23, prolonga o tempo de vida de células T e B em cultura e medeia a adesão aos tecidos e inflamação. Camundongos knockout para IL-4 e IL-4Ra apresentam defeitos na diferenciação de células Th2 e níveis séricos reduzidos de IgG1 e IgE (Akdis, 2011).

1.3.4 Interleucina 6 (IL-6)

A Interleucina 6 (IL-6) é produzida pelas células T, células B, granulócitos, células musculares lisas, eosinófilos, condrócitos, osteoblastos, mastócitos, células da glia, ceratinócitos, células endoteliais, fibroblastos, monócitos e macrófagos em resposta a diferentes estímulos (IL-1, IL-17 e TNF- α) durante a inflamação sistêmica. Seu receptor consiste em uma cadeia de ligação à IL-6 (IL-6Ra) e o componente indutor de sinal (gp130). O IL-6R existe nas formas solúveis e ligadas à membrana. O gene humano de IL-6 é mapeado no locus 7p2E153 e contém 5 éxons e 4 íntrons (Akdis, 2011).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica multifuncional envolvida na regulação de respostas imune humoral e celular, nas respostas de fase aguda, hematopoiese e inflamação. Dentre as funções dessa interleucina está a de direcionar o tráfego e a ativação de leucócitos e induzir a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos na imunidade inata e, ainda, promover a proliferação de células T, a diferenciação e sobrevivência de células B e a produção de plasmócitos produtores de IgG, IgA e IgM.

Monócitos/macrófagos são estimulados pelo LPS bacteriano, IL-1 α , TNF- α , IFN- γ e GM-CSF para produzir IL-6, cuja liberação é inibida por glicocorticoides (Akdis, 2011).

A IL-6 desempenha um papel importante na diferenciação em plasmócitos de células B estimuladas. Também foi demonstrado que IL-6 induz a diferenciação de células T citotóxicas aumentando a expressão de IL-2R e a produção de IL-2. O TGF- β estimula, na presença de IL-6, a diferenciação de linfócitos T virgens em células Th17 pró-inflamatórias, levando à autoimunidade e à inflamação. Além disso, a IL-6 pode converter células Treg de ocorrência natural em células Th17 (Akdis, 2011).

A diferenciação dos macrófagos e a maturação dos megacariócitos são induzidos pela IL-6. Nas células neuronais, a IL-6 suporta a sobrevivência dos neurônios colinérgicos e leva à indução da síntese do hormônio adrenocorticotrófico (Akdis, 2011).

1.3.5 Interleucina 10 (IL-10)

A citocina anti-inflamatória IL-10 é um importante regulador das respostas imunes e é produzida por monócitos, células T, B, NK, macrófagos, células dendríticas (CDs) e mastócitos. Ela é secretada como um homodímero que consiste em 2 subunidades, cada uma com 178 aminoácidos com peso molecular de 18 kd. O complexo receptor para a IL-10 é composto por 2 cadeias. O IL-10R1 que é expresso em células T, células B, NK, monócitos, mastócitos e CDs e IL-10R2 que é expresso em todas as células. As células Th1 e Th2 são capazes de produzir a IL-10, mas dentre as células T, a Treg é a principal fonte dessa citocina (Akdis, 2011).

Os efeitos inibitórios da IL-10 são: regular negativamente a expressão de MHC de classe II e moléculas coestimuladoras na superfície de macrófagos e monócitos, afetando a apresentação de antígenos; inibir a expressão de diversas citocinas inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF e TNF- α , e quimiocinas, incluindo proteína quimioatraente de monócitos (MCP)-1, MCP5, proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1a, MIP1 β , RANTES, IL-8 e proteína 10 induzível por IFN- γ (IP-10) e receptores de quimiocinas; mediar a tolerância a alérgenos; afetar a ativação de células T pela supressão de CD28, CD2 e sinalização do co-estimulador induzível de células T por meio da tirosina fosfatase SHP-1. Já nas células B humanas, a IL-10 promove a sobrevivência, proliferação e diferenciação e aumenta a produção de IgG4. A função primordial da IL-10 é limitar a produção de citocinas e quimiocinas induzidas por agonistas de TLR (principalmente LPS) em macrófagos e CDs. Porém, uma função importante da IL-10 é aumentar a sobrevivência de células B humanas, bem como

sua proliferação, diferenciação e troca de isotipo. A função imunossupressora de IL-10 é muito importante para a proteção do hospedeiro contra as respostas inflamatórias exageradas a infecções microbianas e doenças autoimunes (Akdis, 2011).

Um efeito inibitório indireto da IL-10 na via de sinalização do NF- κ B foi demonstrado. Os fatores repressoros transcricional ETV3 e o corepressor *strawberry notch homolog 2* (homólogo notch 2 de morango) inibiram os genes transcricionais ativados pelo NF- κ B, sugerindo que eles contribuem para os efeitos anti-inflamatórios a jusante da IL-10, inibindo seletivamente a transcrição de genes específicos induzidos pelo LPS de uma maneira que requer a síntese de novas proteínas. A diminuição de TNF- α pela IL-10 resultou da inibição da transcrição e não da degradação do mRNA ou outras modificações pós-transcricionais. Os efeitos anti-inflamatórios da IL-10 parecem depender também da STAT3 (Akdis, 2011).

1.3.6 Interleucina 12p70 (IL-12p70)

A IL-12 é um heterodímero composto por uma cadeia leve de 35 kd (p35) e uma cadeia pesada de 40 kd (p40). É produzido por monócitos ativados, macrófagos, neutrófilos, micróglia e CDs. A IL-12p70 consiste nas subunidades p35 e p40 e se liga a um receptor heterodimérico composto por IL-12Rb1 e IL-12Rb2. Cada subunidade do receptor é expressa por células T ativadas e células NK, juntamente com CDs e linhagens de células B (Akdis, 2011).

A IL-12 medeia o desenvolvimento e a manutenção das células Th1 induzindo a produção de IFN- γ pelas células Th1 e NK. A IL-12 ativa indiretamente a atividade antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral dos macrófagos e promove a atividade citolítica das células NK e das células citotóxicas ativadas por linfocinas. A produção reduzida de IL-12 prejudica as respostas Th1 e aumenta a suscetibilidade à infecção por patógenos intracelulares. Devido à sua localização em cromossomos diferentes, a expressão de proteínas das 2 subunidades é regulada independentemente e, quando são coexpressas na mesma célula formam o heterodímero IL-12p70 biologicamente ativa. Ambas as subunidades estão ligadas covalentemente por uma ligação dissulfeto entre Cys74 de p35 e Cys177 de p40 para formar a IL-12 p70 ativa e a expressão de p40 é limitada a células fagocíticas que produzem IL-12p70 (Akdis, 2011).

Uma variedade de diferentes organismos patogênicos induz altos níveis de produção de IL-12p70, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, parasitas, vírus e fungos. O gene p40 é regulado no nível da transcrição e é altamente induzível por

produtos microbianos. Numerosos fatores de transcrição, incluindo membros da família NF- κ B (p50, p65 e c-Rel), IRF-1, proteína de ligação de consenso IFN e membros da família Ets podem se ligar e regular o promotor p40 (Akdis, 2011).

A produção de IL-12 é regulada positivamente pelo IFN- γ que é induzido pela própria IL-12. A IL-12 participa de um ciclo de feedback positivo ao promover a secreção de IFN- γ que, por sua vez, estimula potentemente monócitos e PMNs para produção adicional de IL-12. Por outro lado, a produção de IL-12 é inibida pela IL-10, IL-11, IL-13 e IFNs tipo I. Os receptores acoplados à proteína G, incluindo os receptores para MCP1, prostaglandina E2, histamina e a ligação cruzada do receptor Fc, também inibem a produção de IL-12, embora alguns receptores acoplados à proteína G, como CCR5, regulem positivamente a sua produção (Akdis, 2011).

1.3.7 Interleucina 17A (IL-17A)

A nível estrutural, a família IL-17 representa uma família distinta de citocinas sem similaridade de sequência com quaisquer outras citocinas ou proteínas conhecidas. As regiões C terminais de todos os membros da família IL-17 são conservados e contêm 4 cisteínas que representam uma estrutura denominada nó de cisteína. IL-17A é uma glicoproteína composta por 155 aminoácidos e atua como um homodímero ligado por pontes dissulfeto com um peso molecular de 35 kd. Também existem heterodímeros de IL-17A e IL-17F. A cascata de sinalização a jusante dos receptores envolve MAPKs, bem como as vias NF- κ B e PI3K-Akt. O ativador 1 NF- κ B liga-se à cauda citoplasmática de IL-17RA e, assim, atua como um adaptador crítico para a sinalização do IL-17RA (Akdis, 2011).

IL-17A é expressa por células CD4 Th17 ativadas, mas sua expressão também foi detectada em células T CD8, células T $\gamma\delta$, células NK e neutrófilos. IL-17A é expressa por fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais vasculares, células B e T, células mielomonocíticas e células estromais da medula óssea. Ao induzir as células a produzirem quimiocinas, a IL-17A atrai os neutrófilos para mediar as defesas contra diferentes patógenos. A IL-17A atua em uma variedade de células que respondem pela expressão positiva de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e metaloproteases. Há a indução potente de IL-6 e IL-8 (CXCL8) em fibroblastos pela IL-17A, com relatos de indução de outras quimiocinas CXC como CXCL1 (Gro-a), CXCL6, CXCL10 e CINC em diferentes células e ocorre, também, a resposta de monócitos por meio da secreção de TNF- α e IL-

1 β . A IL-17A pode induzir fatores estimuladores de colônias como GM-CSF e G-CSF e o MCP1 (Akdis, 2011).

A IL-17A tem um papel crucial no recrutamento de neutrófilos, sendo importante na proteção contra patógenos extracelulares e protozoários, como *Klebsiella pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, *Porphyromonas gingivalis*, mas também em infecções por *Candida albicans*, além de estar envolvida em vários distúrbios inflamatórios, como na psoríase. A IL-23 é uma indutora de IL-17A e compartilha a subunidade p40 com a IL-12 (Raphael, 2015)

1.3.8 Interferon-gama (IFN- γ)

O IFN- γ é um homodímero de 34 kd, produzido por células NK, NKT, macrófagos, células mielomonocíticas que fazem parte do ramo inato e as células Th1, linfócitos T citotóxicos e células B que compõe o sistema imunológico adaptativo. Uma única molécula de IFN- γ interage com 2 cadeias IFNGR1 (ou IFNGR a) de ligação ao ligante e 2 cadeias IFNGR2 (ou IFNGR b) transdutoras de sinal. Cada cadeia é um membro da família de receptores de citocinas de classe II. O IFN- γ age nas células epiteliais, macrófagos, DCs, células NK, células T e B (Akdis, 2011).

Altos níveis de IFN- γ são expressos por células Th1, ativando macrófagos para matar micróbios, têm propriedades antivirais, promove atividades citotóxicas de outras células e induz apoptose de células epiteliais na pele e mucosa. Além de seu papel no desenvolvimento da resposta Th1 e na mudança do isotipo da célula B para IgG2a, o IFN- γ regula a expressão de proteínas MHC classes I e II e a apresentação de antígenos. O IFN- γ também inibe o crescimento celular e a apoptose, mas ainda controla a extensão da resposta imune induzindo a morte celular induzida por ativação de células T CD41 (Akdis, 2011).

1.3.9 Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)

O Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina inflamatória produzida por macrófagos/monócitos durante a inflamação aguda e é responsável por diversos eventos de sinalização dentro das células, levando à necrose ou apoptose (Idriss, 2000). Essa citocina também é secretada por células B, células T, células NK, fibroblastos, entre outras (Aronson, 2016).

O TNF- α é uma citocina que tem efeitos pleiotrópicos em vários tipos de células. Foi identificado como um importante regulador das respostas inflamatórias e é conhecido

por estar envolvido na patogênese de algumas doenças inflamatórias e autoimunes. Estruturalmente, o TNF- α é uma proteína homotrímica composta por 157 aminoácidos. É funcionalmente conhecido por desencadear uma série de várias moléculas inflamatórias, incluindo outras citocinas e quimiocinas (Jang, 2021).

A maioria dos PPRs desencadeia a produção de TNF, que afeta quase qualquer tipo de célula, incluindo os macrófagos, promovendo sua atividade inflamatória e controlando sua sobrevivência e morte (Wajant, 2019).

O TNF- α processado induz várias atividades biológicas por meio dos receptores tipo 1 (TNFR1) e tipo 2 (TNFR2). O TNF transmembranar (tmTNF- α) atua tanto no TNFR1 quanto no TNFR2, mas suas atividades biológicas são mediadas principalmente pelo TNFR2 (Jang, 2021). Ambos os receptores pertencem à chamada superfamília de receptores de TNF, que inclui FAS, CD40, CD27 e RANK (Idriss, 2000).

O TNFR1 é expresso em todos os tecidos humanos e é o principal receptor de sinalização para o TNF- α . O TNFR2 é geralmente expresso em células imunes e facilita respostas biológicas limitadas. Em geral, o TNF- α liga-se aos seus receptores e então transmite sinais moleculares para funções biológicas como inflamação e morte celular. O TNFR1 é ativado tanto pelo TNF solúvel (sTNF- α) quanto pelo tmTNF- α , e liga-se ao domínio de morte (DD) que interage com a proteína adaptadora do domínio de morte associado ao TNFR1 (TRADD) (Jang, 2021). O bloqueio da ligação TNF ao TNFR1 reduz a inflamação ao impedir que o TNFR1 ative a via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e a via canônica do fator nuclear- κ B (NF- κ B), que, de outra forma, levariam coletivamente à regulação positiva da transcrição de genes pró-inflamatórios subjacentes à patologia inflamatória (Van Loo, 2023).

1.3.10 Interleucina-8 (CXCL8/IL-8)

A IL-8 desempenha um papel importante na imunidade inata, fornecendo uma primeira linha de defesa contra patógenos invasores, ela faz parte da família de quimiocinas CXC e é produzida por monócitos e macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células endoteliais e células epiteliais após estimulação com IL-1- α , IL-1- β , IL-17, TNF- α ou TLRs (Akdis, 2011).

As principais funções efetoras da IL-8 são a ativação e o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção ou lesão, atração de células NK, células T, basófilos

esse recrutamento pode estar associado à IL-3 e através do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (Akdis, 2011).

O gene que codifica IL-8 consiste em 4 éxons e 3 íntrons e está localizado em um agrupamento de genes no braço longo do cromossomo 4. O promotor de IL-8 contém locais de ligação para os fatores de transcrição NF- κ B (-80 a-71) e AP-1 (-123 a -12). A IL-8 é gerada como uma proteína precursora não glicosilada de 99 aminoácidos e secretada após a clivagem de uma sequência líder de 22 aminoácidos (Akdis, 2011).

O processamento enzimático no N-terminal resulta em múltiplas isoformas: os monócitos produzem principalmente uma isoforma de 72 aminoácidos com um peso molecular de 8,3 kd e apenas pequenas quantidades das isoformas de 77 aminoácidos, 70 aminoácidos e 69 aminoácidos (Akdis, 2011).

Os receptores para IL-8 são CXCR1 (IL-8RA, CDw128a) e CXCR2 (IL-8RB, CDw128b), ambos expressos em todas as células produtoras dessa quimiocina. A presença de IL-8 não influencia a dimerização do receptor, e as afinidades dos dímeros CXCR1 e CXCR2 para IL-8 são semelhantes às das interações homoméricas correspondentes. A ligação de IL-8 a CXCR1 ou CXCR2 ativa a fosfolipase C, que cliva o fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato em inositol (1,4,5) trifosfato e diacilglicerol. O inositol (1,4,5) trifosfato aumenta o Ca²⁺ citosólico, enquanto o diacilglicerol junto com o Ca²⁺ leva à ativação da proteína cinase C e do fator de transcrição NF- κ B (Akdis, 2011).

A transcrição da IL-8 é um processo rápido, sendo que o IL-8mRNA pode ser detectado por Northern blot em 1 hora após a estimulação das células, e a expressão máxima é alcançada após 6 horas e persiste por 6 horas. A regulação dessa transcrição parece depender do estímulo, do seu receptor e do tipo celular. Nos monócitos humanos e células epiteliais brônquicas, TNF- α e LPS ativam as MAP cinases JNK, ERK e p38. JNK, por sua vez, ativa o fator de transcrição NF- κ B, que induz a atividade do promotor de IL-8 (Akdis, 2011).

1.3.11 RANTES (CCL5/RANTES)

Rantes ou CCL5 é uma quimiocina pró-inflamatória que é regulada após a ativação e é expressa e secretada por células T normais. Ele medeia predominantemente a quimiotaxia e ativação de células T, mas também de monócitos, granulócitos, mastócitos e células dendríticas, sendo expressa principalmente por células T, mas existem outras fontes celulares importantes, como plaquetas, adipócitos,

monócitos/macrófagos e fibroblastos. O aumento da expressão no tecido adiposo e o aumento das concentrações séricas de RANTES estão associados à obesidade, diabetes tipo 2 e outros fatores de risco cardiovascular (Herder, 2011).

1.3.12 Monocina induzida por Interferon- γ (CXCL9/MIG)

O MIG é uma quimiocina inflamatória, membro da subfamília CXC, importante no recrutamento de células T ativadas para locais de infecção. Dentre as funções de MIG está a de aumentar a polarização de Th1 e Th2, atraindo células Th1 e inibindo a migração de Th2. Ele é induzido pelo IFN- γ , que quando liberado em resposta à infecção viral, a CXCL9 recruta linfócitos TCD8+ para o local da infecção, onde eles podem eliminar as células infectadas e acredita-se que as células CD14+, que incluem monócitos e macrófagos, compreendem a maioria das células secretoras de MIG, mas ele também pode ser secretado por neutrófilos, APC, células B e eosinófilos (Berthoud, 2011).

A secreção de MIG por monócitos/macrófagos pode ser induzida pelo IFN- γ e mediada pela via de sinalização JAK-STAT. A secreção de MIG é, portanto, uma indicação de um sinal JAK-STAT funcional pelo receptor para o IFN- γ (Berthoud, 2011).

1.3.13 Proteína Quimioatraente de Monócitos-1 (CCL2/MCP-1)

O MCP-1/CCL2 é um membro da família das quimiocinas CC e um potente fator quimiotático para monócitos, localizado no cromossoma 17, a MCP-1 humana é composta por 76 aminoácidos e tem 13 kDa de tamanho. A CCL2 é produzida por uma variedade de tipos de células, constitutivamente ou após indução por estresse oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento (Deshmane, 2009).

O CCL2 é produzido por muitos tipos de células, incluindo células endoteliais, fibroblastos, epiteliais, musculares lisas, mesangiais, astrócitos, monocíticas e microgliais. Essas células são importantes para as respostas imunes antivirais na circulação periférica e nos tecidos. No entanto, monócitos/macrófagos são considerados a principal fonte de CCL2 (Deshmane, 2009).

CCL2 regula a migração e infiltração de monócitos, linfócitos T de memória e células natural killer (NK). O CCL2 está entre os membros mais estudados da família das quimiocinas e demonstrou ser um ponto de intervenção potencial para o tratamento de várias doenças, incluindo esclerose múltipla, artrite reumatóide, aterosclerose e diabetes resistente à insulina. Ele medeia seus efeitos por meio de seu receptor CCR2 que tem expressão restrita a certos tipos de células. Existem duas formas de *splicing* alternativo

de CCR2, ou seja, CCR2A e CCR2B, que diferem apenas em suas caudas C-terminais. CCR2A é a principal isoforma expressa por células mononucleares e células musculares lisas vasculares, enquanto monócitos e células NK ativadas expressam predominantemente a isoforma CCR2B. É possível que CCR2A e CCR2B possam ativar diferentes vias de sinalização e exercer diferentes ações. CCL2 recruta monócitos para focos de inflamação ativa (Deshmane, 2009).

Além de recrutar e direcionar o movimento dos leucócitos, evidências indicam que o CCL2 pode influenciar a imunidade das células T. A expressão de CCL2 está associada ao desenvolvimento de respostas polarizadas para Th2, ela aumenta a secreção de IL-4 pelas células T. Em doenças imunomediadas para o ramo Th2, como a asma, o CCL2 é expresso em níveis elevados, atuando como um fator potente na polarização de células Th0 em direção ao fenótipo Th2 (Deshmane, 2009).

1.3.14 Interferon- γ induzido pela Proteína-10 (CXCL10/IP-10)

A quimiocina IP-10/CXCL10 possui uma fase de leitura aberto de 1173 pb contendo 4 exons e codificando uma proteína de 98 aminoácidos com massa molecular de 10 kDa. É secretada por leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, epitélios, células endoteliais e estromais e ceratinócitos em resposta ao IFN- γ (Liu, 2011).

O CXCL10 é uma molécula pleiotrópica capaz de promover a atividade quimiotática de células CXCR3+, induzir apoptose, regular o crescimento e proliferação celular, bem como a angiogênese em doenças infecciosas, inflamatórias e câncer e essas funções são possíveis a partir do receptor CXCR3, que está acoplado à proteína G transmembrana e é expresso em linfócitos T, B ativados, células natural killer (NK), células dendríticas e macrófagos. A indução de CXCL10 depende predominantemente da região carboxi-terminal de CXCR3, que é essencial para a internalização de CXCR3, quimiotaxia e mobilização de cálcio induzida pelo ligante CXCL10 (Liu, 2011).

O CXCL10 induz quimiotaxia, apoptose, inibição do crescimento celular e angiostase. Níveis anormais de CXCL10 foram observados em fluidos corporais de indivíduos infectados com vírus, bactérias, fungos e parasitas indicando um importante papel na patogênese dessas doenças (Liu, 2011).

1.4 RECEPTORES EM MACRÓFAGOS PARA O TNF E ATIVAÇÃO DA VIA DO NFκB

Os macrófagos estão na primeira linha de defesa contra vários patógenos, mas também estão envolvidos na manutenção da homeostase tecidual e para cumprir essas funções eles reconhecem uma ampla gama de padrões moleculares associados a patógenos e danos (PAMPs/DAMPs) pela membrana plasmática e pelos receptores de reconhecimento de padrões intracelulares (PRRs) (Wajant, 2019).

O TNF exerce suas atividades pela estimulação dos receptores TNFR1 e TNFR2, que desencadeiam vias de sinalização distintas e comuns que podem funcionar de maneira interligada (Wajant, 2019). Quando o domínio característico de homologia do TNF (DHT) medeia a automontagem em moléculas triméricas e a ligação ao receptor, as formas transmembrana e a solúvel do TNF interagem com esses dois receptores (Figura 2) (Wajant, 2019).

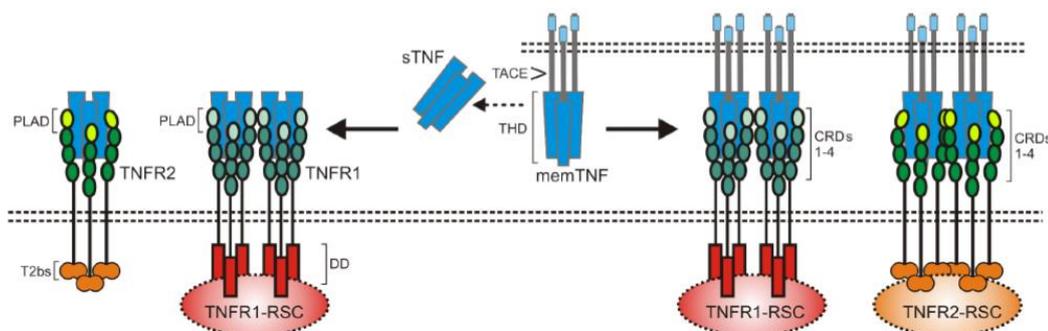


Figura 2- O sistema TNF-TNFR1-TNFR2. Como outros receptores do TNFRSF, TNFR1 e TNFR2 são caracterizados por domínios ricos em cisteína (CRD) em sua parte extracelular. O TNFR1 abriga ainda um domínio de morte (DD) e o TNFR2 um sítio de ligação TRAF2 (T2bs). O TNF ocorre em duas formas, como um ligante trimérico ligado à membrana (memTNF) e como uma molécula solúvel também trimérica (sTNF). O TACE processa o memTNF para o sTNF. Observe que o memTNF estimula ambos os receptores para o TNF, enquanto o sTNF falha amplamente em estimular o TNFR2, apesar da ligação de alta afinidade. PLAD, domínio de montagem de ligação pré-ligante. (Fonte: Wajant, 2019).

Os receptores para o TNF são representantes típicos da superfamília de receptores de TNF (TNFRSF), eles são proteínas transmembrana tipo I de extensão única caracterizadas por terem vários domínios ricos em cisteína (DRCs) em seu domínio extracelular. As variantes solúveis do receptor para o TNF inibem o TNF por competir com as espécies de receptores celulares pela ligação ao TNF, mas possivelmente também por atuar como moléculas negativas dominantes. De fato, os DRCs N-terminais dos TNFR1 e TNFR2 não estão diretamente envolvidos na ligação ao ligante, mas medeiam a auto associação inativa na ausência do ligante (Wajant, 2019).

O TNFR1 é um receptor de morte (RM) e abriga um domínio de morte (DD) em sua parte citoplasmática (Wajant, 2019). O DD é um tipo conservado de domínio de interação proteína-proteína que permite que os RMs interajam homotipicamente com proteínas citoplasmáticas que também abrigam um DD. Proteínas de sinalização contendo DD ligam TNFR1 a vias de sinalização citotóxicas desencadeando apoptose ou necroptose, mas também permitem o envolvimento de vias de sinalização que ativam fatores de transcrição do NF- κ B ou cinases da família MAP cinase (Wajant, 2019). Existem vários mecanismos que suprimem a sinalização citotóxica pelo TNFR1, de modo que a sinalização indutiva gênica pró-inflamatória pode ser considerada como o modo padrão da atividade do TNFR1.

O TNFR2 não tem DD e é um receptor TNFRSF prototípico do fator associado ao receptor de TNF (TRAF). Assim, há um pequeno motivo de aminoácidos próximo ao C-terminal de TNFR2 que permite o recrutamento da proteína adaptadora TRAF2 e proteínas associadas a TRAF2, como TRAF1 e inibidor celular da proteína de apoptose 1 (cIAP1) e cIAP2. O TNFR2 estimula a sinalização do NF- κ B e a ativação de várias cinases.

A forma solúvel e a transmembranar do TNF se ligam com alta afinidade aos dois tipos de receptores do TNF e os dados cristalográficos revelaram um modo estrutural semelhante de ligação ao ligante pelo TNFR1 e TNFR2. (Wajant, 2019). O TNF transmembranar ativa a sinalização de forma eficiente ao TNFR1 e TNFR2, já a ligação do TNF solúvel resulta apenas no caso de TNFR1 em ativação forte e geral do receptor (Wajant, 2019).

TNFR1 é expresso por quase todo tipo de célula, já a expressão de TNFR2 é restrita a certos tipos celulares, incluindo células mielóides, células T reguladoras, células gliais e alguns tipos de células endoteliais, mas também pode ser induzido em células epiteliais, fibroblastos e certos subconjuntos de células T e B. O TNFR2 é frequentemente expresso em malignidades hematopoiéticas e em alguns tumores sólidos. O TNF não é expresso constitutivamente e, em vez disso, é facilmente induzido em células imunes ativadas, mas também é expresso por fibroblastos e células endoteliais e epiteliais em resposta a gatilhos pró-inflamatórios e citocinas, incluindo o próprio TNF (Wajant, 2019).

1.4.1 Vias de sinalização relacionadas a TNFR1

Após a ligação do TNF solúvel ou ligado à membrana ao TNFR1, como esse receptor contém as proteínas citoplasmáticas que se ligam ao domínio de morte, ele recruta preferencialmente o TRADD, e a proteína cinase-1 de interação com o receptor (RIPK1) devido às interações DD-DD. E pode desencadear as vias de morte celular por apoptose ou necroptose ou a ativação da via do NF- κ B. A deficiência ou diminuição do RIPK1 aumenta o recrutamento do TRADD e TRAF2 para o TNFR1, mas em contraste, a deficiência ou queda de TRADD reduz o recrutamento do TRAF2. TRAF2 e TRADD interagem com alta afinidade fora de seu DD, sugerindo que TRADD ligado a TNFR1 e, em menor grau, RIPK1 ligado a TNFR1, recrutam homotrímeros TRAF2 (ou heterotrímeros TRAF1-TRAF2) para o complexo de sinalização TNFR1. Com TRAF2, as E3 ligases cIAP1 e cIAP2, que já formam complexos com homotrímeros TRAF2 (ou heterotrímeros TRAF1-TRAF2) no citoplasma, tornam-se co-recrutadas para o complexo de sinalização TNFR1. Os cIAPs modificam vários componentes do complexo de sinalização TNFR1, em particular RIPK1 que criam sítios de ligação para o complexo de montagem da cadeia de ubiquitina linear E3 ligase (LUBAC), que modifica ainda mais o RIPK1 com cadeias de ubiquitina linearmente ligadas que permitem o recrutamento do fator de crescimento transformador β (TGF β) MAP3K – quinase-1 ativada (TAK1) pelo TGF- β e a proteína 2 de ligação a MAP3K7 através da proteína adaptadora TAK1-proteína de ligação-2 (TAB2) e do complexo inibidor de kappa B cinases (IKK). TAK1 agora pode fosforilar e ativar a subunidade IKK2 do complexo IKK e desencadear desta forma os eventos da via NF- κ B clássica, incluindo fosforilação e degradação do inibidor de kappa B-alfa (I κ B α), liberação e translocação nuclear de dímeros NF- κ B previamente inibidos por I κ B α e transcrição de vários alvos regulados pelo NF- κ B. Outros fatores que podem modular a sinalização do TNFR1 γ são as proteínas inibidoras de ICE do tipo FADD (FLIPs), cIAP2, A20 e TRAF1 (Wajant, 2019) (Figura 3).

A cadeia de eventos descrita emerge do complexo de sinalização TNFR1 localizado na membrana plasmática (complexo I) e permite a produção de quantidades funcionais relevantes de proteínas reguladas pelo NF- κ B em menos de 1 h (Wajant, 2019). Com o tempo, o complexo de sinalização do TNFR1 começa a internalizar e com isso ocorre a liberação das moléculas de sinalização ligadas ao TNFR1 (Wajant, 2019). No citoplasma, este último pode formar complexos citoplasmáticos livres de receptores (também denominados complexos II α e II β) com FADD, caspase-8 e RIPK3 que podem permitir a indução de apoptose ou necroptose. As células apoptóticas liberam vesículas apoptóticas envoltas por membrana contendo o conteúdo celular da célula doente que são

eliminadas por macrófagos sem desencadear inflamação. Em contraste, a necroptose é uma forma lítica de morte celular que libera DAMPs intracelulares e citocinas pró-inflamatórias, o que promove inflamação (Wajant, 2019).

A necroptose induzida pelo TNF pode atenuar os efeitos inflamatórios da ativação contínua do TNF em algumas circunstâncias. Assim, o efeito final inflamatório induzido pelo TNFR1 *in vivo* é determinado pela interação complexa da sinalização pela via do NF-κB, ou pode levar à apoptose e/ou necroptose (Wajant, 2019).

A sinalização pelo TNFR1, TRADD, FADD, RIPK1, TRAF2 e TAK1 não são importantes apenas para ativação da via canônica do NF-κB e supressão da capacidade indutora de morte celular pelo TNFR1, mas também desencadeiam as cascatas de MAP cinase levando à ativação de JNK e p38 (Wajant, 2019).

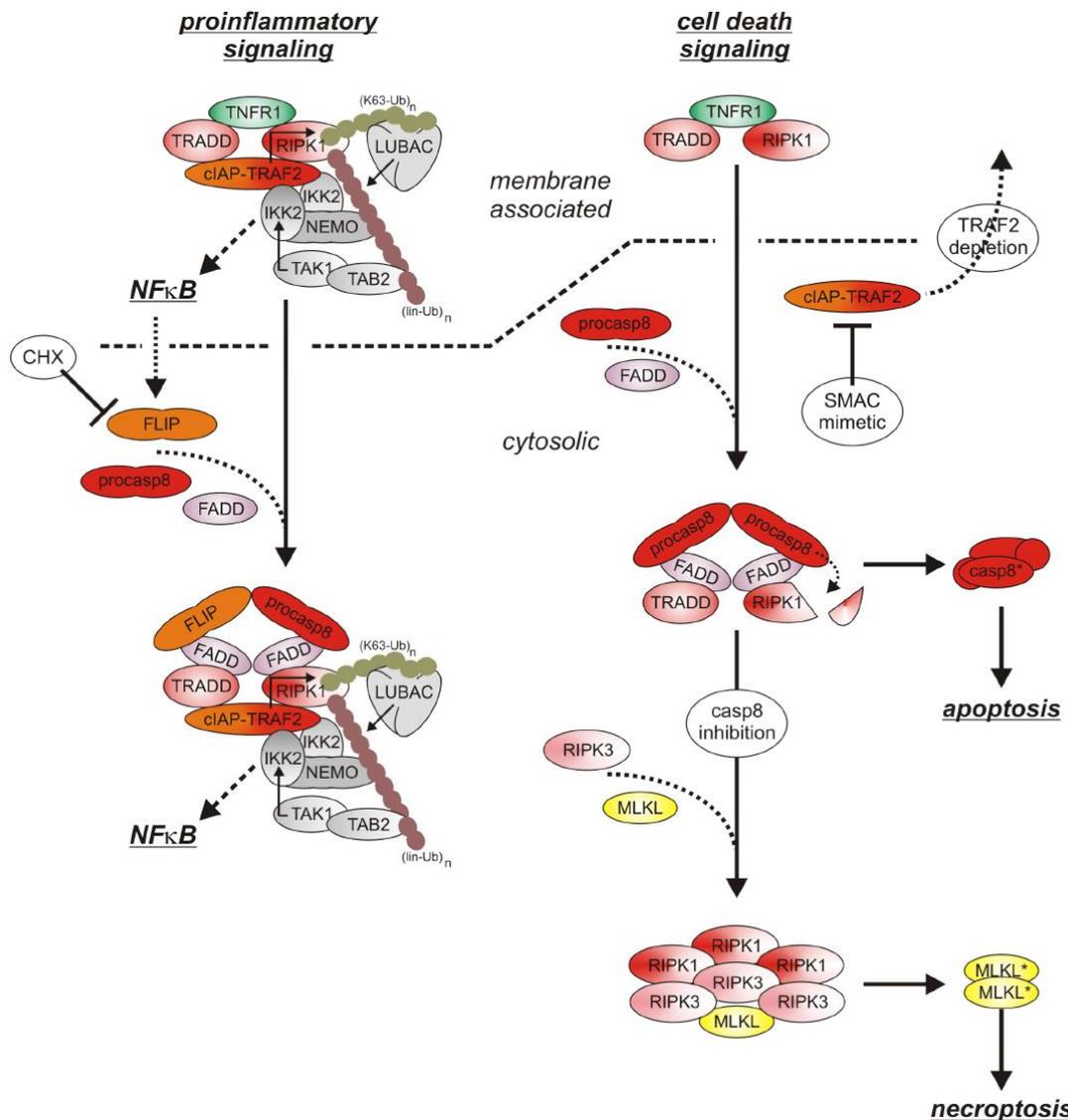


Figura 3- Sinalização pelo TNFR1. O estado padrão da sinalização pelo TNFR1 resulta na ativação de vias pró-inflamatórias, como a via canônica do NF-κB. Se as proteínas FLIP e os complexos TRAF2-cIAP1/2 forem limitados, via da sinalização pelo TNFR1 muda para apoptose.

Não antes que a atividade da caspase-8 seja limitada sob condições apoptóticas, há finalmente a indução de necroptose (FONTE: Wajant, 2019).

1.4.2 Vias de sinalização relacionadas ao TNFR2

O TNFR2 oligomerizado recruta TRAF2 junto com seus parceiros de ligação fortemente associados TRAF1, cIAP1 e cIAP2, semelhante ao recrutamento indireto mediado por TRADD/RIPK1 dessas proteínas no contexto da sinalização pelo TNFR1. Embora não haja evidência de um papel de TRADD e/ou RIPK1 na sinalização pelo TNFR2, o LUBAC, bem como o complexo IKK, também são recrutados para o complexo de sinalização TNFR2, porém, menos eficientemente que no TNFR1. A estimulação do TNFR2 pode também ativar a via clássica do NF- κ B (Wajant, 2019) (Figura 4).

Os níveis de expressão na superfície celular do TNFR2 são regularmente muito mais altos do que os de TNFR1. O recrutamento dos complexos TRAF2-cIAP1/2 e TRAF1-TRAF2-cIAP1/2 para o TNFR2 pode, portanto, levar a uma depleção significativa desses complexos no citoplasma e afetar outras atividades dessas moléculas. O TRAF2 e os cIAPs estão constitutivamente envolvidos no citoplasma na inibição da via não canônica do NF- κ B, que é de especial relevância para o controle da atividade dos dímeros p52-RelB do NF- κ B. Em virtude de sua capacidade de reduzir o pool citosólico de complexos contendo TRAF2, o TNFR2 é capaz de ativar a via não canônica do NF- κ B. (Wajant, 2019). A depleção induzida pelo TNFR2 dos complexos TRAF2-cIAP1/2 citosólicos resulta no acúmulo de NIK ativo e na fosforilação mediada pelo NIK da proteína precursora NF κ B p100. O p100 fosforilado torna-se K48-ubiquitinado e é então processado pelo proteassoma para a subunidade p52, resultando na ativação de dímeros NF- κ B contendo p100 (Wajant, 2019) (Figura 4).

A depleção induzida por esse receptor do pool citosólico dos complexos TRAF2-cIAP1/2 e TRAF1-TRAF2-cIAP1/2 pode limitar a disponibilidade dessas proteínas para outros receptores. Observou-se que a pré-estimulação do TNFR2 afeta o recrutamento de TRAF2 e cIAPs para TNFR1 e, assim, atenua a capacidade de TNFR1 de estimular a sinalização pela via canônica do NF- κ B. Devido à relevância de TRAF2 e cIAPs para prevenir apoptose e necroptose no contexto da sinalização do TNFR1, a depleção/degradação mediada por TNFR2 dessas moléculas pode resultar em aumento da morte celular induzida em macrófagos pela sinalização pelo TNFR1 (Wajant, 2019). O TNF e seus receptores constituem, portanto, uma rede de sinalização complexa, o que se

reflete no fato de efeitos aditivos, sinérgicos ou mesmo antagônicos terem sido relatados para os dois tipos de receptores para o TNF (Wajant, 2019).

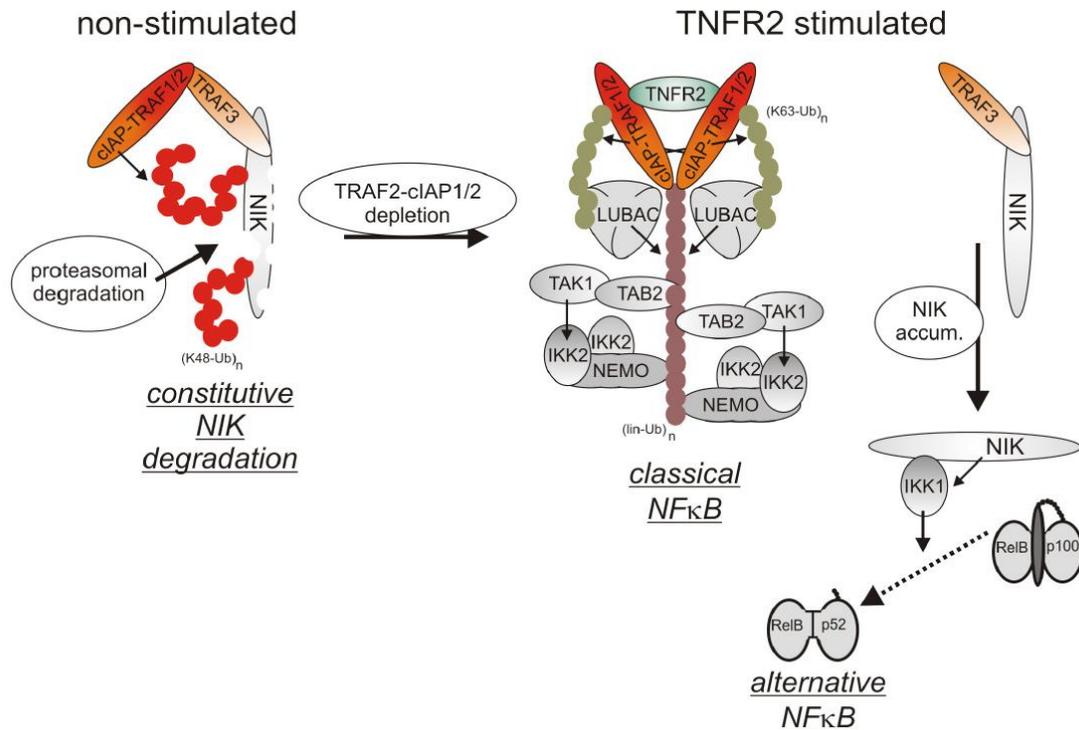


Figura 4. Sinalização pelo TNFR2. O TNFR2 recruta eficientemente os complexos TRAF2-cIAP1/2 e TRAF1-TRAF2-cIAP1/2 que permitem a ativação da via canônica do NF-κB. O recrutamento de TNFR2 dos complexos TRAF2-cIAP1/2 e TRAF1-TRAF2-cIAP1/2 esgota concomitantemente o conjunto citossólico destas proteínas e as impede de desencadear a degradação da via não canônica de NF-κB estimulando a cinase NIK. Assim, o TNFR2 também ativa a via não canônica do NF-κB (FONTE: Wajant, 2019)

1.4.3 Receptor para LINFOTOXINA (rLTX)

As linfotoxinas (LTX α e LTX β), o LIGHT (*LT-related inducible ligand that competes for glycoprotein D binding to herpesvirus entry mediator on T cells* - ligante induzível relacionado com a linfotoxina que compete com o vírus herpes pela ligação à glicoproteína D para entrada no linfócito T), o TNF e seus receptores específicos LT β R, HVEM, TNFR1 e TNFR2 formam a família direta da grande superfamília do TNF. Os genes-alvo regulados pela via LTX $\alpha\beta$ -LTX β R incluem as quimiocinas organizadoras de tecidos, CXCL13, CCL19 e CCL21, que estabelecem circuitos de citocinas que regulam a localização dos linfócitos, levando à organização do tecido linfóide (Schneider, 2004; Ware, 2005).

Em determinadas doenças infecciosas, as vias ativadas pela LTX $\alpha\beta$ também são importantes para respostas imunes inatas e adaptativas envolvidas na defesa do

hospedeiro, como a regulação da produção do interferon- β pela sinalização de LTX β R e TNFR que pode desempenhar um papel crucial em certas infecções virais (Schneider, 2004).

Os sistemas LTX $\alpha\beta$ e LIGHT além de desempenharem papéis importantes na regulação da expressão gênica crucial para as defesas inatas e adaptativas contra patógenos podem contribuir para os mecanismos de tolerância imunológica necessários para controlar doenças autoimunes (Schneider, 2004).

TNF e LTX têm propriedades estruturais e funcionais compartilhadas, mas cada sistema contribui com funções únicas, demonstrando a natureza altamente integrada dessas vias de sinalização. As citocinas induzidas pela LTX são mais relacionadas ao desenvolvimento e organização de estruturas linfoides secundárias, sendo que o LIGHT tem um papel limitado no desenvolvimento, mas parece funcionar nas respostas das células T (Schneider, 2004).

Os padrões de sobreposição de ligação ligante-receptor são uma característica importante da família direta. As LTX α e LTX β formam três ligantes distintos, um homotrímero secretado de LTX α (LTX α 3) e dois heterotrímeros ancorados na membrana, LTX α 1 β 2 (forma predominante) e LTX α 2 β 1, com a subunidade LTX β fornecendo a âncora de membrana. A LTX α 3, assim como o TNF, se liga a dois receptores, TNFR1 e TNFR2. Por outro lado, LTX α 1 β 2 sinaliza via LTX β R. A LTX α 2 β 1 liga aos TNFR1 e TNFR2, mas é uma forma de menor expressão, sem um papel biológico claro. O LIGHT é um segundo ligante para o LTX β R, mas também interage com HVEM, que também pode servir como um terceiro receptor para LTX α . Embora a utilização compartilhada de ligantes e receptores na família direta sugira redundância funcional, estudos de deleção de genes em camundongos revelaram papéis únicos e operacionais para cada par ligante-receptor no desenvolvimento e função do sistema imunológico. A expressão temporal de ligantes e receptores durante o desenvolvimento e a homeostase também contribuem para a especificidade, assim como a localização espacial dos ligantes, seja como moléculas ancoradas à membrana, que necessitam de contato celular para sinalização, ou como proteínas secretadas que atuam em tecidos distantes. Mecanismos reguladores que afetam a indução e a estabilidade da transcrição e padrões celulares restritos de expressão contribuem para a especificidade da sinalização, bem como para a ativação de vias de sinalização distintas (Figura 5) (Schneider, 2004).

As famílias de fatores de transcrição do NF- κ B são ativadas pelos sistemas TNF-TNFR1 e LTX $\alpha\beta$ -LT β R e regula centenas de genes cruciais para o desenvolvimento de

células e órgãos das respostas imunes inata e adaptativa. A ligação ao LTXR resulta na ativação de genes envolvidos em reações pró-inflamatórias, incluindo quimiocinas, como proteína inflamatório de macrófagos-1b (MIP-1b) e MIP-2, bem como integrinas, como a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM- 1), atraindo e localizando leucócitos para áreas de inflamação. A ativação da via p52/RelB pela sinalização pelo LTX β R resulta na translocação dos dímeros NF- κ B para o núcleo, levando à transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento de órgãos linfóides e manutenção da arquitetura em órgãos linfóides secundários (Schneider, 2004; Ware, 2005).

Os fenótipos de camundongos deletados para vários membros do NF- κ B são complexos, e afetam o desenvolvimento e as funções imunológicas. Os mecanismos de propagação de sinais iniciados pela ligação de LTX β R e TNFR1 são distintos, respondendo em parte por seus papéis únicos na função imunológica; ainda, alguns elementos dessas vias são compartilhados (por exemplo, TRAF2), contribuindo assim para suas ações complementares. Os TNFR1 e LTX β R ativam a via NF κ B1/RelA. O TNFR1 é ativado por meio da interação de seu domínio de morte com a proteína cinase de interação com o receptor e TRAF2, enquanto o LTX β R atua por meio de um motivo peptídico de interação com TRAF. A capacidade do TNFR1 de ativar os genes pró-inflamatórios é muito mais forte do que o LTX β R. Em parte, isso pode ser devido à capacidade de LTX β R de ativar a via NF κ B2 dependente de IKK α , que pode atenuar a expressão gênica ativada por NF κ B1/RelA. A transcrição de NF κ B2 (p100) é dependente de NF κ B1/RelA, ligando essas vias. Os genes-alvo ativados por essas vias de sinalização provavelmente chegam às centenas e, com sua elucidação, uma imagem mais clara do sistema imunológico está começando a surgir (Schneider, 2004) (Figura 5).

A necessidade de sinalização pela LTX não é uniforme em relação a diferentes patógenos, e de uma perspectiva evolutiva, essa variação na exigência de sinalização pela LTX provavelmente reflete contribuições específicas do patógeno para escapar das vias subjacentes ativadas pela LTX (Schneider, 2004).

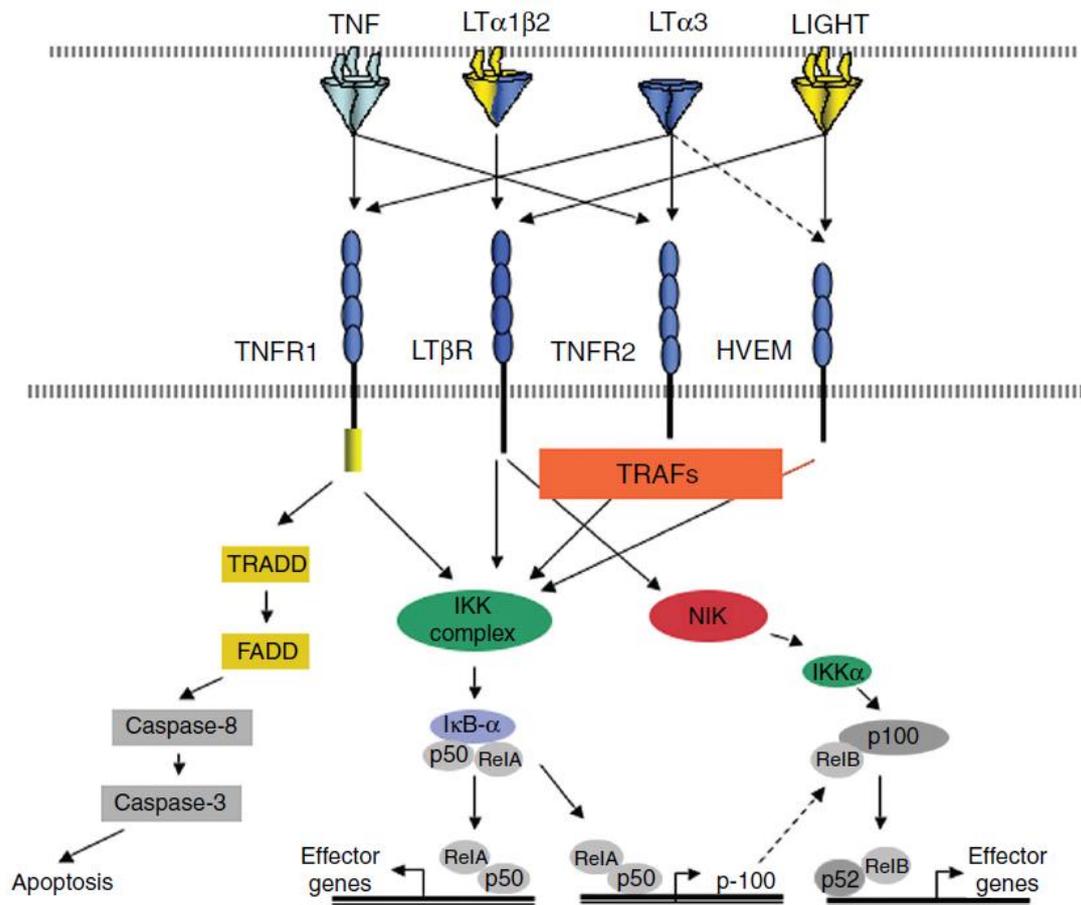


Figura 5. A família central do fator de necrose tumoral (TNF) e as vias de sinalização. As interações das citocinas TNF com seus receptores cognatos são mostradas por setas. A ligação do ligante ao receptor leva à indução de cascatas de sinalização a jusante. A presença de um DD na porção intracelular do receptor (representado em amarelo) resulta no recrutamento do domínio de morte associado ao receptor TNF 1 (TNFR1) (TRADD) e na indução final da apoptose. Na ausência de um DD, os TNFRs interagem diretamente com as moléculas do fator associado ao receptor de TNF (TRAF) para induzir a sinalização através da via canônica do fator nuclear κ B (NF- κ B), resultando na translocação de heterodímeros NF- κ B (ou seja, p50/RelA) para o núcleo para induzir genes efetores. O LT β R também induz uma via NF- κ B não canônica envolvendo o processamento de p100 e a translocação de p52/RelB para o núcleo. HVEM, mediador de entrada do HSV; FADD, domínio de morte associado ao Fas; IKK, I κ B cinase; NIK, cinase indutora de NF- κ B. Fonte: Schneider, 2004.

1.5 Vias do Fator de transcrição Nuclear Kappa B (NF κ B)

O NF- κ B está envolvido em processos fisiológicos e patológicos, podendo controlar a transcrição de mais de 400 genes, a incluir citocinas, quimiocinas e seus moduladores, receptores imunes e não imunes, proteínas envolvidas na apresentação de antígenos e adesão celular, proteínas de fase aguda e resposta ao estresse, reguladores de apoptose, fatores de crescimento, outros fatores de transcrição e seus reguladores, bem como diferentes enzimas e todas essas moléculas estão envolvidas no controle de processos biológicos (Gómez-Chávez, 2021).

As proteínas que fazem parte das vias do NF- κ B são o NF κ B1 (p105/p50), NF κ B2 (p100/p52), p65 (RelA), c-rel e RelB, e elas possuem uma região N-terminal conservada que é denominada domínio de homologia Rel (RHD), parte responsável por mediar a dimerização, ligação ao DNA, translocação para o núcleo e interação com proteínas inibidoras de NF- κ B (I κ B's) (Gómez-Chávez, 2021).

Os membros da família do NF- κ B, podem interagir e formar de 12 a 15 dímeros passíveis de ligação ao DNA, podendo regular a transcrição gênica e essas interações contribuem para a especificidade de vários painéis de genes regulados. Essa especificidade para sítios de ligação ao DNA faz com que os dímeros apresentem diversas interações como proteína-proteína com promotores-alvo e são ativados sob condições fisiológicas particulares (Gómez-Chávez, 2021).

Dentre as proteínas do NF- κ B, a p65, c-Rel e RelB contêm domínios de ativação transcricional (TADs) em suas regiões carboxi-terminais, (C), necessárias para a translocação do dímero NF- κ B para o núcleo, mas as proteínas p50 e p52, que são geradas pelo processamento proteolítico de seus respectivos precursores, p105 e p100, não possuem os domínios de ativação transcricionais, mas podem formar heterodímeros com proteínas portadoras de TAD, modificando a especificidade para os sítios κ B; reprimindo a transcrição por meio de bloqueio aos sítios de ligação κ B em homodímeros ou promovendo o recrutamento para outras proteínas contendo TADs (Gómez-Chávez, 2021). O p105 e p100 são processados constitutivamente, contudo o p105 é cortado com maior eficiência e as células exibem altos níveis de p50, contrastando com os níveis mais baixos de p52 (Gómez-Chávez, 2021).

Mesmo tendo diversidade de combinações de dímeros, o heterodímero mais comum é formado pelo p50 e p65, que normalmente está ligado a um de seus inibidores no citoplasma de células não estimuladas (Gómez-Chávez, 2021).

O conjunto de moléculas pleiomórficas do NF- κ B é ativado por uma grande quantidade de estímulos e também regula incontáveis genes e eventos. Dentre os estímulos podemos citar as citocinas (interleucina-1 e fator de necrose tumoral), glicocorticóides, produtos provenientes de vírus e bactérias, irradiação ultravioleta, produtos de reações de enzimas como a óxido nítrico sintase induzível e a ciclooxygenase tipo 2 (Glezer, 2000). Seja qual for o estímulo, estudos mostram a participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento de cálcio intracelular na indução da ativação das vias do NF- κ B (Glezer 2000).

1.5.1 A Via canônica do NFκB

Na via canônica de ativação do NF-κB, várias moléculas desempenham papéis importantes, como os receptores de superfície celular (TLRs), receptores para o fator de necrose tumoral (TNFR) e receptores de interleucina-1 (IL-1R), as cinases ativadoras como IκB (IκB cinase - IKK). Isso resulta na transcrição de uma variedade de genes envolvidos em processos inflamatórios, imunológicos e de sobrevivência celular (Sun, 2017).

A via canônica medeia a ativação de NF-κB1 p50, RelA e c-Rel, predominantemente e pode ativar também o NFκB2, p52 e RelB e a via não canônica ativa preferencialmente o RelB e o p52, e conta ainda com NIK, IKK α, β e γ, p100 (precursor do NFκB2). A via canônica responde a estímulos de diversos receptores imunológicos e leva à ativação rápida, mas transitória, do NF-κB. Um primeiro passo na cascata de sinalização intracelular é a ativação da cinase 1 ativada por TGFβ (TAK1; também conhecida como MAP3K7), que, por sua vez, ativa um complexo trimérico IκB cinase (IKK), composto por subunidades catalíticas (IKKα e IKKβ) e regulatórias (IKKγ; também conhecidas como NEMO). O complexo IKK então fosforila IκBα ou outros membros da família IκB, como p105. Os membros fosforilados da família IκB sofrem ubiquitinação e degradação proteossômica, resultando na liberação e translocação nuclear dos membros canônicos da família NF-κB, predominantemente os dímeros NFκB1 p50-RelA e NFκB1 p50-c-Rel. A fosforilação de p105 mediada pelo IKK direciona esta molécula semelhante a IκB para degradação completa, embora também possa promover o processamento de p105 (isto é, a geração de NFκB1 p50) em alguns tipos de células, contribuindo para a indução da translocação nuclear de membros NF-κB sequestrados por p105, incluindo NFκB1 p50, RelA e c-Rel. Evidências genéticas sugerem que IKKγ e IKKβ são cruciais para mediar a degradação de IκBα dependente de fosforilação e a translocação nuclear canônica de NF-κB, enquanto IKKα parece desempenhar um papel de apoio na ativação da via canônica do NF-κB (Sun, 2017).

Contrastando com a ativação rápida e transitória da via NF-κB canônica, a ativação da via do NF-κB não canônica é lenta e persistente. Indutores típicos da via não canônica do NF-κB são ligantes de um subconjunto de membros da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), que em sua maioria também estimula a via canônica e medeia processos biológicos que envolvem a cooperação funcional entre as duas vias (Sun, 2017).

Os heterodímeros da via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) constituídos das duas subunidades p65 (RelA) e p50 podem ser ativados por diversas famílias de vírus e essa ativação pode ter funções como promover a replicação viral, prevenir a apoptose induzida pelo vírus e mediação da resposta imune ao invasor (Hiscott, 2001). O NF- κ B impede que a citocina pró-inflamatória, fator de necrose tumoral alfa (TNF α), induza a apoptose em resposta a inflamações ou infecções virais. Essa citocina é produzida principalmente por macrófagos (Chu,2013).

1.5.2 A Via não canônica do NF- κ B

Um das principais moléculas da via não canônica do NF- κ B é a molécula NIK (cinase indutora de NF- κ B), um componente central e específico que integra vários sinais do TNFR, resultando na ativação de membros não canônicos como o IKK α , que fosforila diretamente o p100. Porém o IKK α também responde a estímulos canônicos, mediando a ativação canônica da via NF- κ B por certos indutores, embora essa seja a função predominante de IKK β , ela ativa sua função como ativadores transcricionais e modula a transcrição geral de genes por meio da fosforilação de componentes da cromatina e coativadores transcricionais (Sun, 2017).

A sinalização não canônica de NF- κ B ativa predominantemente NF κ B2 p52 e RelB, embora membros adicionais de NF- κ B, como RelA, estejam associados a p100 e, em alguns tipos de células, sejam ativados por meio da indução do processamento de p100. NF- κ B2 p52 e RelB normalmente funcionam como um heterodímero para induzir a transcrição do gene alvo, mas também podem funcionar independentemente em algumas condições (Sun, 2017).

A ativação da via não canônica NF- κ B é baseada no processamento de p100 que é rigidamente controlado por sinal e ocorre de maneira estritamente induzível, levando à geração de NF κ B2 p52, bem como à translocação nuclear de membros de NF- κ B associados a p100, predominantemente RelB e NF κ B2 p52. O processamento do p100 é induzido por meio de sua fosforilação em resíduos de serina C-terminal específicos (serinas 866 e 870), o que desencadeia a ubiquitilação de p100 por meio do recrutamento da ubiquitina ligase E3 β TrCP, que induz a fosforilação de p100 por meio da ativação da cinase IKK α (Sun, 2017).

O NF κ B2 p52 coopera com o membro canônico do NF- κ B c-Rel para induzir a expressão da citocina inflamatória GM-CSF nas células T. Nas células B, a deleção combinada de RelB e NF κ B2 resulta em defeitos das células B mais graves do que as

deleções únicas. Nas células dendríticas (DCs), uma grande proporção de RelB é regulada pelo $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ e ativada pela via canônica NF- κ B. Além disso, a ativação do RelB pelo receptor de células T (TCR) é apenas parcialmente dependente da via não canônica (Sun, 2017).

O mecanismo bioquímico de ativação do NIK merece mais estudos e é necessário um melhor entendimento das funções específicas do tipo celular da via não canônica do NF- κ B na regulação das respostas imunes e inflamatórias. Seria interessante estudos futuros que explorem a eficácia terapêutica de inibidores das pequenas moléculas de NIK no tratamento de doenças inflamatórias (Sun, 2017).

1.5.3 A Via do NF- κ B na gestação

A via do NF- κ B regula a apoptose, proliferação celular, inflamação e controle das respostas imunes inatas e adaptativas durante o início do trabalho de parto, nas quais tem um papel crucial (Gómez-Chávez, 2021). A ativação precoce dessa molécula pode resultar na indução do parto prematuro, com resultados ruins para a mãe e para o feto (Gómez-Chávez, 2021).

Naturalmente, no trato genital feminino, o NF- κ B desempenha um papel na regulação da resposta imune inata, pois uma resposta hipoinduzida poderia favorecer a colonização de patógenos, enquanto uma resposta hiperinduzida poderia causar inflamação e dano tecidual excessivo (Gómez-Chávez, 2021).

Já na gestação, as citocinas produzidas sob a regulação do NF- κ B são de extrema importância para a implantação do feto, através da indução da expressão de moléculas de adesão no embrião e nas superfícies maternas, promovendo a regulação da expressão de proteases que remodelam a matriz extracelular, promovendo a invasão e diferenciação de trofoblastos. A ativação excessiva do NF- κ B após a implantação pode ativar uma resposta descontrolada, contribuindo para distúrbios no desenvolvimento do feto, como restrição de crescimento intrauterino, aborto ou parto prematuro (Gómez-Chávez, 2021).

No parto, o NF- κ B ativado está envolvido na regulação da produção de prostaglandinas e citocinas inflamatórias que contribuem para o início do trabalho de parto, provocando a expressão de genes que, por sua vez, promovem a atividade contrátil do útero e a dilatação do colo do útero.

O NF- κ B desempenha um papel crucial na regulação da expressão gênica e na resposta inflamatória durante a gestação e sua ativação pode influenciar a implantação do

embrião, a progressão da gravidez e o início do trabalho de parto, contribuindo para o desenvolvimento saudável da gestação (Figura 6).

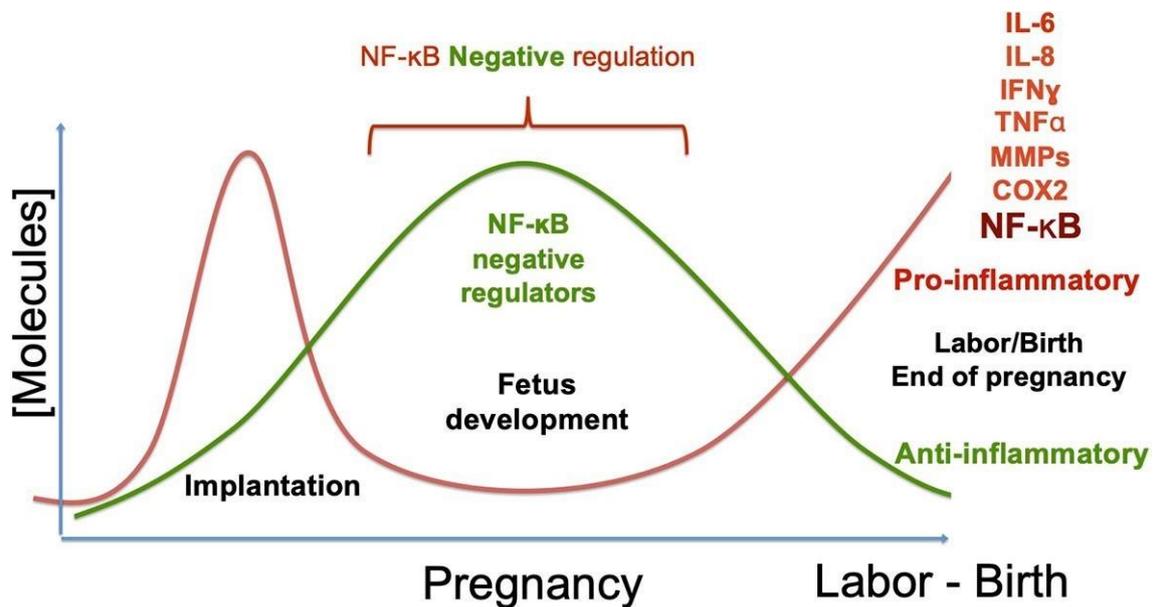


FIGURA 6- Regulação do NF- κ B durante a gravidez. A implantação do feto requer o desenvolvimento de um fenótipo inflamatório, que depende da atividade do NF- κ B. Em gestações não complicadas, o ambiente pró-inflamatório muda para um fenótipo anti-inflamatório durante o desenvolvimento do feto, regulando negativamente o NF- κ B. Uma vez que o desenvolvimento do feto está completo, a produção de moléculas anti-inflamatórias diminui e a expressão de moléculas inflamatórias é desencadeada novamente. Nesse momento quando a produção das citocinas muda de anti-inflamatório para inflamatório inicia o trabalho de parto, induzindo moléculas como IL-6, IL-8, TNF- α , metaloproteinases e COX2, e induzindo as contrações regulares e a ruptura das membranas fetais. Como consequência da mudança para um ambiente inflamatório, promove-se o nascimento da criança. As complicações primárias da gravidez ocorrem quando o trabalho de parto começa prematuramente; ou seja, quando a alteração do perfil ocorre antes do desenvolvimento completo do feto, o que favorece a gravidez pré-termo ou mesmo o aborto. Portanto, a regulação negativa de moléculas inflamatórias é necessária durante o desenvolvimento fetal, ressaltando o papel proeminente da regulação da atividade do NF- κ B no equilíbrio inflamatório/anti-inflamatório necessário (FONTE: Gómez-Chávez, 2021).

1.5.4 A Via do NF- κ B em neurônios/neuroblastos

O neuroblastoma (NB) é um câncer infantil raro cuja agressividade se deve à várias alterações genéticas cromossômicas, incluindo aquelas que conferem evasão da resposta imune. As células dos NB adotam várias estratégias moleculares para evitar o reconhecimento pelo sistema imunológico, incluindo a regulação negativa de ligantes para receptores de ativação das células *natural killer* (NK) (Brandetti, 2021).

A via do NF- κ B nos neurônios é ativada por vários agentes, mas ainda não está esclarecido quais os estímulos que determinam a ativação constitutiva da via. Estímulos

autócrinos e parácrinos possivelmente atuam para aumentar a atividade do NF- κ B. Tem também sido considerado a possibilidade que a via do NF- κ B atue como uma maneira de sinalização retrógrada ligando a sinalização pela sinapse neurológica à eventos de transcrição. O glutamato, que se liga a receptores neuroexcitatórios, e o óxido nítrico ativam a via do NF- κ B neuronal e a translocação do p65/RelA para o núcleo dos neurônios dependente de estimulação neuronal tem sido demonstrada. A atividade do NF- κ B é necessária para a sobrevivência neuronal e a superexpressão de NF- κ B em neurônios primários confere um alto grau de neuroproteção por meio da indução de genes anti-apoptóticos. Os estudos demonstram um importante papel do NF- κ B no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. O bloqueio da atividade neuronal endógena de NF- κ B em neurônios corticais usando adenovírus recombinante induziu a morte neuronal, enquanto a indução da atividade de NF- κ B aumentou os níveis de proteínas anti-apoptóticas e foi fortemente neuroprotetora. O NF- κ B tem uma função fisiológica na manutenção da sobrevivência dos neurônios centrais. Entretanto, quais as funções precisas do NF- κ B no sistema nervoso ainda não estão totalmente esclarecidas. Diversos estudos mostraram que a atividade do NF- κ B facilita a sobrevivência neuronal, entretanto, também tem sido mostrado que a ativação de NF- κ B é necessária para a morte neuronal (Bhakar, 2002)

A via do NF- κ B é uma importante via de sinalização celular que regula a expressão de genes envolvidos em processos como inflamação, imunidade, desenvolvimento, apoptose e neuroplasticidade. O NF- κ B é encontrado em quase todos os tipos de células animais, mas tem funções específicas e essenciais em neurônios e células da glia (Kaltschmidt, 2009).

A ativação do NF- κ B é desencadeada por uma variedade de estímulos, como estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação de LDL e antígenos virais e bacterianos (Gilmore, 2006). No sistema nervoso central (SNC), o NF- κ B tem um papel crucial na modulação da plasticidade sináptica, da memória, do desenvolvimento neuronal, da neurogênese, da neuroinflamação e da neurodegeneração (Kaltschmidt, 2009). O NF- κ B é encontrado em uma forma ativada constitutiva, diferente da encontrada nas células da glia, em muitos neurônios, *in vivo*. A localização nuclear das subunidades p50 e RelA foi detectada em neurônios do córtex e hipocampo (Meffert, 2004). O NF- κ B pode ser ativado especificamente por glutamato (via receptores NMDA e AMPA/KA) e neurotrofinas (via receptores Trk) em neurônios. Esses estímulos são importantes para a indução da plasticidade sináptica de longa duração (LTP) e da memória

(Kaltschmidt, 2009). O NF- κ B também pode ser ativado por citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α e IL-1 β) e estresse oxidativo em células da glia. Esses estímulos são envolvidos na resposta imune e inflamatória do SNC, mas também podem induzir a morte neuronal em condições patológicas (Kaltschmidt, 2009).

O NF- κ B está envolvido nos mecanismos moleculares de ação de vários psicofármacos, como antidepressivos, antipsicóticos, ansiolíticos, opióides e canabinóides. Esses fármacos podem afetar a atividade do NF- κ B direta ou indiretamente, alterando a expressão ou a função de seus reguladores ou alvos. Alguns antidepressivos podem inibir a ativação do NF- κ B induzida por estresse ou citocinas em células da glia, reduzindo assim a neuroinflamação e aumentando a neurogênese (Duman, 2012). Alguns antipsicóticos podem aumentar a expressão do NF- κ B em neurônios corticais e hipocámpais, modulando assim a plasticidade e a função neuronal (Albensi, 2000). Alguns ansiolíticos podem interferir na ativação do NF- κ B mediada por glutamato em neurônios do hipocampo, afetando a memória e a aprendizagem. Alguns opióides podem ativar o NF- κ B em neurônios corticais por meio da estimulação dos receptores para opióide do subtipo μ , sugerindo a participação desse fator no desenvolvimento da dependência ou da tolerância aos opióides (Ninkovic, 2004).

Diversas subunidades do fator nuclear κ B medeiam efeitos opostos de sinais extracelulares na sobrevivência dos neurônios. Enquanto o RelA é ativado por agentes neurotóxicos, o c-Rel gera efeitos neuroprotetores (Sarnico, 2008)

A expressão de Fas é diretamente regulada pelo NF- κ B. A superexpressão transitória da subunidade NF- κ B p65 tem um papel crucial no aumento da expressão de superfície do Fas e PVR (glicoproteína transmembranar tipo I), o ligante de DNAM-1, tornando assim as linhagens de células de NB significativamente mais suscetíveis à apoptose mediada pelas células NK, pelo reconhecimento e morte. Em contraste, o tratamento com IFN e TNF, embora tenha induzido a regulação positiva de Fas em células de NB e, conseqüentemente, aumentado a apoptose mediada pelas células NK, desencadeou processos de evasão imune, incluindo a forte regulação positiva de MHC classe I e IDO1, ambos os quais estão envolvidos em mecanismos que levam ao comprometimento de uma morte adequada das células dos NB mediada pelas células NK (Brandetti, 2021)

Na isquemia cerebral, os fatores RelA e p50 são ativados rapidamente, e foi associada à inibição do dímero c-Rel/RelA e sem alteração de p50/c-Rel. Essa ativação é conhecida por induzir os genes pró-apoptóticos Bim e Noxa. O direcionamento da

expressão de c-Rel e RelA revelou que os dímeros de c-Rel reduziram a suscetibilidade neuronal à anóxia, enquanto p50/RelA aumentou (Sarnico, 2008).

Os dímeros contendo c-Rel, p50/c-Rel e RelA/c-Rel, mas não p50/RelA, promoveram a transcrição de Bcl-xL. No interior de uma célula neuronal, o equilíbrio entre a ativação dos complexos contendo p50/RelA e c-Rel ajusta o limiar da vulnerabilidade do neurônio ao insulto isquêmico (Sarnico, 2008). O glutamato ou a β -amilóide ativam principalmente as subunidades p50 e RelA e a interleucina-1 β neuroprotetora, os agonistas do receptor mGlu5 e a leptina ativam o c-Rel, além das proteínas p50 e RelA (Sarnico, 2008). Os dímeros c-Rel promovem especificamente a transcrição do gene Bcl-xL (Sarnico, 2008).

Portanto, o NF- κ B é um fator de transcrição multifuncional que regula vários processos celulares no SNC. A compreensão da sua regulação e função pode trazer novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos fisiopatogênicos de doenças que afetam o sistema nervoso como para o desenvolvimento de novos fármacos.

1.6 DROGAS

1.6.1 Atazanavir

O uso de antirretrovirais como o atazanavir (ATZ) marcaram a mudança na infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Ele é um inibidor seletivo do processamento específico pelo vírus das proteínas virais Gag-Pol nas células infectadas, impedindo em consequência, a formação de vírus maduros e a infecção de novas células (Pillero, 2004).

O ZIKV mostrou-se susceptível à droga ribavirina, usada no tratamento para Hepatite C, sugerindo que drogas que inibem as RNA polimerases virais poderiam ter potencial para impedir a proliferação do vírus e inibir consequentemente a infecção, porém, drogas como a ribavirina não podem ser usadas por gestantes (Kamiyama et al. 2017).

A possível administração de antirretrovirais já utilizados na terapêutica de doenças virais, como o ATZ, poderia facilitar o tratamento contra a infecção pelo ZIKV, pois são drogas já utilizadas em mulheres gestantes como SIDA (Hirschel et al. 2017). No trabalho de Alves e cols, 2015, já foi observado que essas drogas modulam a via do NF- κ B, o que sugere que poderiam modificar a evolução da infecção pelo ZIKV, desde

que o estrito controle dessa via é fundamental para manutenção de uma gravidez normal e possíveis modificações da via poderiam desencadear parto prematura. Os possíveis efeitos do atazanavir na infecção pelo ZIKV está mostrada na Figura 7.

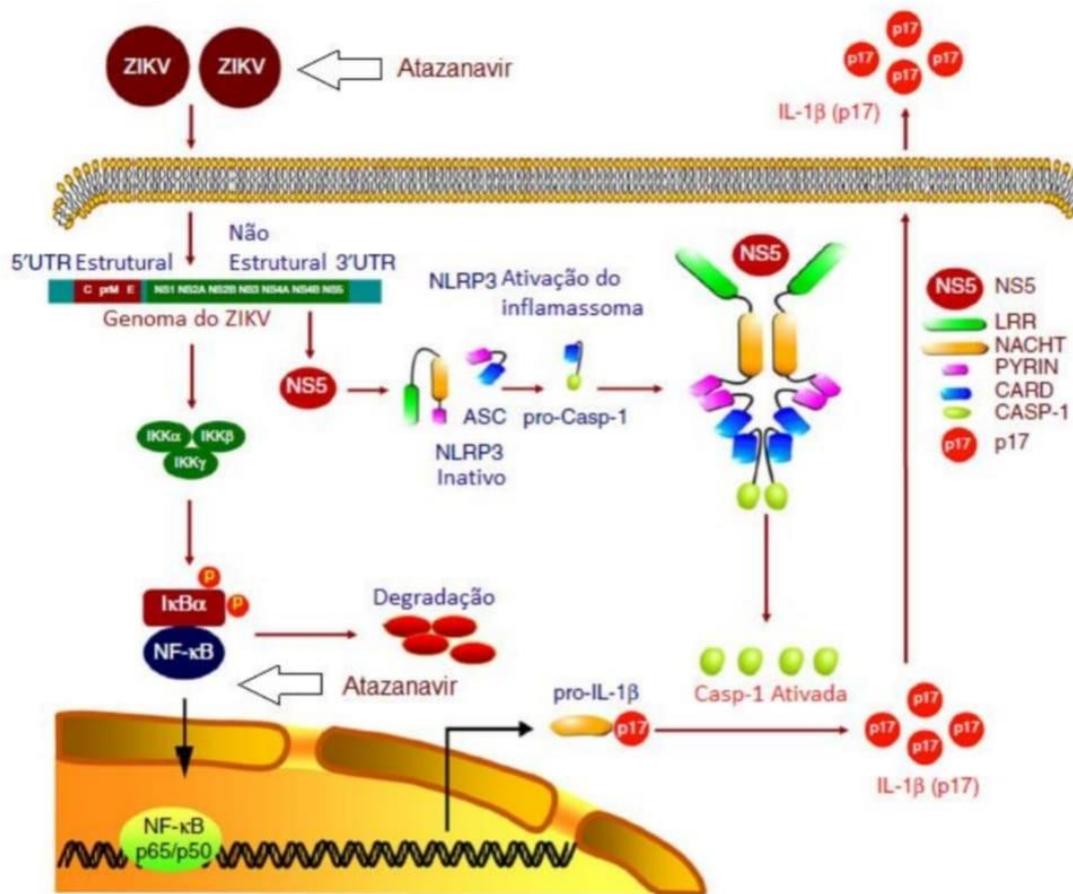


Figura 7- Efeito sugerido do atazanavir no ZIKV e na atividade inflamatória. (Fonte: Corazza, 2021)

1.6.2 Lopinavir

O lopinavir é um medicamento antiviral utilizado no tratamento da infecção pelo HIV-1. Ele se classifica como um inibidor de protease viral, o que significa que seu mecanismo de ação está direcionado à inibição da enzima protease do HIV-1, responsável pela clivagem de poliproteínas do vírus em componentes estruturais e funcionais (Cvetkovic, 2003).

O seu mecanismo de ação contra o HIV consiste em inibir a ação da protease viral, impedindo a formação de novas partículas virais infectivas e, conseqüentemente, a replicação do vírus. Isso reduz a carga viral no organismo, permitindo que o sistema imunológico reaja melhor e retarde a progressão da doença (Uzunova, 2020)

Em relação aos efeitos no sistema imunológico, o lopinavir, assim como outros antirretrovirais, tem como objetivo principal reduzir a carga viral e, portanto, aliviar o estresse inflamatório crônico induzido pelo HIV-1. Ao suprimir a replicação viral, o medicamento ajuda a preservar a função imunológica e a restaurar células CD4+, que são células essenciais para a resposta imune adequada.

É importante salientar que o lopinavir é prescrito como parte de um regime de terapia antirretroviral combinada (TARV) para o tratamento de infecção por HIV-1 e geralmente administrado em combinação com o ritonavir, outro inibidor de protease que ajuda a aumentar os níveis plasmáticos do lopinavir e sua eficácia.

Foi observado que o tratamento com a associação lopinavir/ritonavir (LPV/RTV) diminuiu a fagocitose de *S. cerevisiae* pelos neutrófilos e monócitos de indivíduos saudáveis. Além disso, esses medicamentos também ocasionaram uma redução da produção de ânions superóxido pelos neutrófilos e monócitos e ainda o decréscimo da quimiotaxia dos neutrófilos de indivíduos saudáveis (Alves et al. 2015).

O tratamento com o atazanavir e o lopinavir de macrófagos de camundongos BALB/c também determinou redução da translocação do Rel B do citoplasma para o núcleo do macrófago após a infecção *in vitro* pela *Leishmania (L) amazonensis*. Entretanto, o atazanavir aumentou a expressão total do Rel B no citoplasma dos macrófagos desses camundongos, mas esse aumento não foi acompanhado pela sua translocação do citoplasma para o núcleo quando da infecção *in vitro* pela *Leishmania (L) amazonensis*, mostrando que essas drogas antiretrovirais que são utilizadas no tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, inclusive em gestantes, podem modular a via do NF- κ B (Alves e cols, 2015). Ainda não está esclarecido se essas drogas modulam a produção das moléculas da via do NF- κ B em células infectadas pelo ZIKV e qual a via intracelular que é ativada.

1.6.3 Curcumina

A curcumina é um composto ativo encontrado na cúrcuma, uma especiaria de cor amarelo-laranja comumente usada na cozinha indiana (Shishodia, 2013). Tem sido amplamente estudada por seus potenciais benefícios para a saúde, incluindo seus efeitos anti-inflamatórios e por ser um potente agente imunomodulador da ativação de células T, células B, macrófagos, neutrófilos, células citotóxicas naturais (NK) e células dendríticas, podendo também diminuir a expressão de várias citocinas pro inflamatórias (TNF, IL-1,

IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 e quimiocinas), provavelmente pela inativação do fator de transcrição NF- κ B (Jagetia, 2007).

Estudos em animais sugerem que a curcumina pode ter efeitos benéficos na prevenção e tratamento de doenças autoimunes, como artrite reumatoide, esclerose múltipla e doença inflamatória intestinal. No entanto, mais pesquisas são necessárias para confirmar esses efeitos em seres humanos.

A curcumina é conhecida por inibir diversas vias inflamatórias no organismo, bloqueando, por exemplo, a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que desempenha um papel crucial na produção de moléculas pró-inflamatórias, o que promove a redução da produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β e IL-6. Ela também inibe a atividade de enzimas pró-inflamatórias, como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a lipoxigenase (LOX), que desempenham um papel importante na produção de mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas e leucotrienos. Outro mecanismo pelo qual a curcumina exerce suas propriedades anti-inflamatórias é a modulação da sinalização celular podendo influenciar a atividade de várias proteínas envolvidas na resposta imune e inflamatória, incluindo cinases, fatores de crescimento e proteínas de adesão celular (Shishodia, 2013).

É importante destacar que a curcumina possui uma atividade anti-inflamatória leve em comparação a medicamentos anti-inflamatórios comuns, como os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs). No entanto, ela pode ser usada como uma abordagem complementar no tratamento de inflamações crônicas.

Apesar das suas propriedades anti-inflamatórias promissoras, a curcumina tem uma baixa biodisponibilidade quando consumida isoladamente. Sua absorção pode ser melhorada quando combinada com a piperina, um composto presente na pimenta preta. A curcumina desempenha um papel importante nas condições patológicas mediadas pelo estresse oxidativo, suprimindo as enzimas geradoras de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Shishodia, 2013).

A ativação do NF- κ B pelo éster de forbol, TNF e H₂O₂ é reduzido pela curcumina. Ela suprime o I κ B α , diminuindo expressão de produtos de proliferação celular, antiapoptóticos e metastáticos. Outras ações atribuídas a curcumina que tem efeito sobre a atividade do NF- κ B são: inibir esse fator provocando a redução do óxido nítrico endógeno pela interrupção do crescimento celular na fase G2/M e indução de apoptose em células de melanoma humano e ainda, por inibir a translocação de NF- κ B p65 em

células dendríticas e interromper a função do sistema de proteassoma da ubiquitina (SPU) (Shishodia, 2013).

A curcumina regula o estresse do retículo endoplasmático (RE), mas seu papel parece ser altamente dependente do tipo de célula e das condições experimentais (*in vitro* ou *in vivo*) (Liczbiński, 2020). A curcumina pode aliviar o estresse oxidativo em células normais do tecido adiposo *in vivo*, pode melhorar esse processo *in vitro* em células de câncer de cólon humano, células de carcinoma papilífero de tireóide humano (BCPAP), em linhagem celular K562 de leucemia mielóide crônica (CML) e em linhagem celular de leucemia linfoblástica B-precursora (ALL) (B-Pré-ALL) (Liczbiński, 2020). A curcumina pode desencadear apoptose em células normais, mas em concentrações muito mais altas do que em células cancerígenas (Liczbiński, 2020). As células cancerígenas, ao contrário da maioria dos tipos de células normais, possuem o fator de transcrição NF- κ B ativo que é o principal alvo da ação da curcumina, o que explica principalmente as diferenças na sensibilidade desses tipos de células (Liczbiński, 2020). Em suma, a curcumina reduz o stress oxidativo em células normais (*in vivo*), influencia a apoptose em células cancerígenas (*in vitro*), afeta o ciclo celular nas fases G1/S e G2/M em células cancerígenas (*in vitro*), e afeta a proliferação de células cancerígenas (*in vitro*) (Liczbiński, 2020).

A curcumina suprimiu a expressão induzida por TGF- β do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), TGF- β 1, fibronectina e colágeno I mRNA. A curcumina reduziu os níveis do receptor de TGF- β tipo II e a fosforilação de SMAD2/3 em resposta à adição de TGF- β . A curcumina bloqueou as ações pró-fibróticas do TGF- β nas células HK-2 através da regulação negativa da via de sinalização Smad. A curcumina neutralizou a fosforilação de Smad2 induzida por TGF- β e induziu a regulação positiva do fator induzido por TGF- β (TGIF), um regulador negativo da sinalização de TGF- β , sugerindo um papel essencial de TGIF na supressão de TGF- β /Smad2 mediada pela curcumina (Shishodia, 2012).

Vários trabalhos sugerem que a curcumina modula a expressão de várias citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , outras interleucinas, CXCL, proteína quimioatraente de monócitos (MCP)-1 e proteína inflamatória de macrófagos (MIP) -1 α (Shishodia, 2012).

Os efeitos pró-inflamatórios do TNF são devidos principalmente à sua capacidade de ativar o NF- κ B, levando à expressão de genes inflamatórios como *COX-2*, *LOX*, moléculas de adesão celular, citocinas inflamatórias, quimiocinas e *iNOS*. A curcumina suprime a expressão de TNF nos níveis transcricionais e pós-transcricionais. A curcumina

inibe a expressão tanto do RNAm do TNF quanto da proteína TNF em linhagens celulares de linfoma de células do manto e inibe a produção de TNF- α em monócitos e macrófagos alveolares (Shishodia, 2012).

A curcumina inibiu a produção de IL-8 e aumenta a expressão do IL-8R na superfície celular de cânceres pancreáticos. Vários estudos demonstraram que a curcumina inibiu a expressão de IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18. A curcumina suprimiu a expressão de IL-1 β e IL-6 em células de ceratinócitos humanos tratados com TNF- α pela modulação das vias do NF- κ B e MAPK. A curcumina inibiu a fosforilação de STAT4 induzida pela IL-12 em células T humanas e a fosforilação de STAT3 induzida pela IL-6 e a translocação nuclear em células de mieloma múltiplo (Shishodia, 2012). Um dos mecanismos descritos da atividade da curcumina é a inibição da atividade do proteossoma, podendo aumentar o nível de p53 e induzir apoptose por ativação das caspases 3 e 7, através da ação direta nos reguladores do proteossoma.

A curcumina, *in vitro*, na concentração de 15 μ M afetou a expressão das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 em células de câncer de próstata humano PC-3. No tratamento por 24 horas reduziu os transcritos CXCL1 e CXCL2 em 50%. Além disso, a potência da curcumina foi comparada com a potência do inibidor da cinase I κ B SC-514, em um processo de inibição da fosforilação.

Estimulação das células com TNF- α levou à fosforilação de p65 e I κ B α em células PC-3. As células tratadas por 2 horas com curcumina tiveram uma redução de duas e três vezes na fosforilação de p65 e I κ B α , respectivamente. Além disso, a curcumina prejudicou a translocação de p65 para o núcleo e diminuiu o NF- κ B no citoplasma (Liczbiński, 2020). A curcumina impediu a ativação do NF- κ B pela inibição da fosforilação e degradação do I κ B α , que é o inibidor do κ B α (Liczbiński, 2020).

A curcumina reduz a expressão de proteínas virais e ainda pode atuar como um inibidor de PKC δ reduzindo a fosforilação de resíduos de tirosina específicos. A curcumina pode desempenhar um papel na proteção de vários distúrbios principalmente através da ação anti-inflamatória e antioxidante. A curcumina tem potencial para ser usada no câncer, bem como no tratamento de doenças neurológicas e ela protege o sistema nervoso através do efeito na fosforilação de Akt, Wnt/ β catenina e peptídeo A β (Liczbiński, 2020).

Tsaie e cols (2011) mostraram que a curcumina e os C-NPs [nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) carregadas com curcumina] podem passar através da BHE (barreira hemato-encefálica) para o tecido cerebral e o hipocampo em particular.

Foi comprovado que somente drogas de baixo peso molecular e altamente lipofílicas conseguem penetrar na BHE e essa capacidade de nanopartículas de curcumina e PLGA atravessarem a barreira, se deve a sua natureza hidrofóbica, e tenham alta lipossolubilidade. Esse mesmo estudo mostrou acúmulo de curcumina em várias regiões do cérebro.

1.7 JUSTIFICATIVA

Na infecção da gestante pelo vírus Zika há repercussões tanto para a mãe quando para o feto. Na mãe, além do quadro infeccioso determinado pelo vírus, o parto prematuro pode ser desencadeado com risco de malformações ou mesmo perda fetal. Há repercussões também para o feto em formação, seja como consequências do parto prematuro, seja pelas complicações determinadas pela infecção pelo vírus da própria criança, sendo a mais importante a microcefalia. A principal causa para a microcefalia tem sido mostrada ser a destruição neuronal. Dentre os fatores que podem ocasionar tanto o parto prematuro quanto a destruição neuronal está o desequilíbrio na produção de citocinas inflamatórias. Dentre as citocinas inflamatórias, o TNF pode induzir a morte celular por apoptose ou necroptose, dependendo das vias de ativação do NFκB e dos receptores para o TNF que são estimulados, particularmente quando apresentam o domínio de morte em sua porção intracelular que podem desencadear mecanismos de morte celular. Assim, nossa hipótese é que quando ocorre a infecção da gestante, o vírus Zika poderia interferir nas vias do NFκB em células do sistema imunitário, particularmente monócitos/macrófagos e micróglia particularmente da mãe e em células neuronais, particularmente no feto, e poderia modificar as vias de ativação preferencial intracelular, estimulando a resposta inflamatória prejudicial, pelo próprio vírus, como também o próprio TNF produzido, por um mecanismo de autoestimulação dos seus próprios receptores, também poderia manter a estimulação da via que apresenta o domínio de morte (DD), após ligação do próprio TNF que foi produzido ao seu receptor, num mecanismo de retroalimentação, levando à apoptose neuronal, como também interferindo na replicação viral, e contribuindo para o desenvolvimento da microcefalia por destruição neuronal, como também por interferir na replicação viral.

Além disso, considerando que há um desvio da resposta do sistema imunitário de mulheres no período gestacional para o ramo da imunidade inata com depressão da

resposta de linfócitos T, é provável que no período da gestação a resposta do sistema imunitário à infecção pelo vírus esteja comprometida. O esclarecimento da produção de citocinas poderá contribuir para a melhor compreensão da interação do vírus com as células do hospedeiro humano, e aumentar a probabilidade do desenvolvimento de terapêuticas e produção de vacinas mais eficientes.

É possível que drogas, como o lopinavir, atazanavir e curcumina, que podem modular a via do NFκB, possam ter um papel protetor, tanto para controlar a infecção pelo vírus Zika, quanto para prevenir sua mais grave complicação que é a microcefalia. Portanto, a melhor compreensão das vias de ativação do NF-κB, desde os receptores para o TNF até a ativação das moléculas finais da via, e a consequente produção das citocinas e da ação do atazanavir, lopinavir e curcumina nessas vias de ativação poderá contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatogênicos da infecção pelo vírus Zika na gestante e no desenvolvimento da microcefalia e poderá sugerir a possibilidade de avaliar a utilização dessas drogas moduladoras da via do NFκB para diminuir as graves consequências da infecção tanto na mãe e possivelmente diminuir o risco de microcefalia na criança.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar se há diferenças nas vias intracelulares do NF- κ B que são preferencialmente expressas na infecção *in vitro* pelo vírus Zika em células de linhagem neuroblastoma e nas células mononucleares do sangue periférico de mulheres gestantes ou não e se as drogas antiretrovirais, atazanavir e lopinavir, e o componente bioativo curcumina modificam a expressão das moléculas das vias de ativação do NF- κ B, e avaliar a influência da infecção pelo vírus Zika e o tratamento com essas drogas na produção de citocinas pelos neuroblastomas e pelas células mononucleares do sangue periférico de mulheres gestantes.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar por microscopia eletrônica de transmissão se o vírus Zika é detectado nos neuroblastomas.

Avaliar a influência da incubação *in vitro* com o vírus Zika e do tratamento *in vitro* com o atazanavir, curcumina e lopinavir de neuroblastomas e células mononucleares do sangue periférico de mulheres gestantes:

- 1) na inibição do crescimento do Vírus Zika em cultura
- 2) na produção de citocinas no sobrenadante das culturas de neuroblastoma e das células mononucleares do sangue periférico de mulheres gestantes.
- 3) na expressão dos receptores 1 e 2 para o FNT e do receptor para linfotoxina e de moléculas das vias de ativação do NF- κ B em neuroblastoma em cultura e das células mononucleares do sangue periférico de mulheres gestantes.
- 4) na expressão de algumas moléculas intermediárias representativas das vias canônica e não canônica em neuroblastoma em cultura e das células mononucleares do sangue periférico de mulheres gestantes.
- 4) na expressão das moléculas finais das vias canônica e não canônica do NF- κ B em neuroblastomas em cultura e das células mononucleares do sangue periférico de mulheres gestantes.
- 5) na cinética da produção de citocinas no sobrenadante das culturas de células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes.

MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Na Figura 8 está esquematizado o desenho experimental do trabalho. Para analisar a influência do atazanavir, da curcumina e do lopinavir na infecção in vitro pelo vírus Zika nas células de linhagem neuroblastoma e nas células mononucleares do sangue periférico de mulheres gestantes ou não foram avaliados a inibição do crescimento do vírus tanto em células C6/36 quanto em células mononucleares do sangue periférico, a expressão do receptor para linfotóxina e dos receptores 1 e 2 para o fator de necrose tumoral- α , a expressão das moléculas das vias canônicas e não canônicas do NF κ B e a produção de citocinas nos sobrenadantes das culturas dos neuroblastos e das células mononucleares do sangue periférico de mulheres gestantes ou não incubadas ou não com o vírus ZIKA e tratadas ou não pelas drogas.

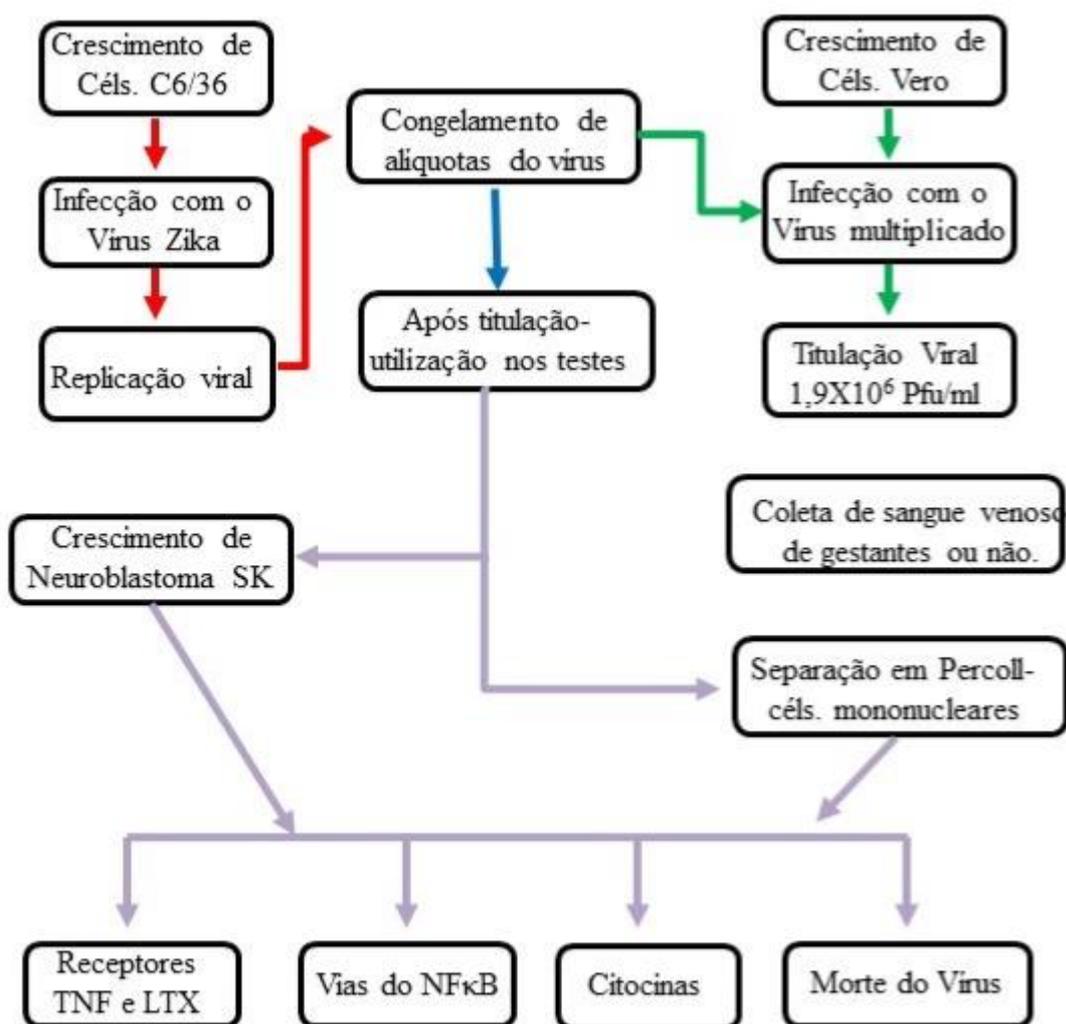


Figura 8- Desenho experimental.

3.2 Tipo de estudo e aspectos éticos

Estudo experimental realizado no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Utilizou-se células de linhagem neuroblastoma SK (ATTC) e células mononucleares do sangue periférico de gestantes até o fim do segundo trimestre de gestação e mulheres não gestantes, ambas saudáveis e que não faziam uso de medicamentos, com idades entre 20 e 40 anos. As normas éticas de pesquisa científica com seres humanos foram obedecidas e o presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB (processo: 61278316.4.0000.5558).

Foram avaliados a viabilidade do vírus após o tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir, os receptores para linfotóxina e para o fator de necrose tumoral (TNF), as vias canônicas e não canônicas do NF- κ B e a produção de citocinas, com as células incubadas ou não com o vírus Zika, tratadas ou não com atazanavir, curcumina e lopinavir.

3.3 Células estudadas

3.3.1 Células C6/36

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

3.3.2 Células Vero

Linhagem celular que teve sua origem de rim de macaco *Cercopithecus aethiops* (macaco verde africano). As amostras foram provenientes da FIOCRUZ- MG, e foram gentilmente cedidos pelo pesquisador Dr Alexandre Vieira Machado. As células eram mantidas em cultivo até alcançarem a confluência máxima de 80%, em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (high glucose), suplementado com 10% de SFB, 10ml de penicilina/estreptomicina e 3,7g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), pH 7,2, e o crescimento foi feito em estufa 37°C, com 5% de CO₂.

3.3.3 Neuroblastoma SK-N-BE (2)

A linhagem celular de neuroblastoma utilizada foi estabelecida em novembro de 1972 a partir de uma biópsia de medula óssea retirada de uma criança com neuroblastoma disseminado após repetidos cursos de quimioterapia e radioterapia. A morfologia das células varia com algumas células com longos processos e outras que são epitelioides. Com o crescimento tendem a agregar, formar aglomerados e flutuar. As células foram adquiridas da ATCC, e o crescimento era feito em uma mistura 1:1 de Meio Essencial Mínimo de Eagle e Meio F12, com 10% de soro fetal bovino, incubadas em estufa 37°C, com 5% de CO₂, em frascos de cultivo estéreis.

3.3.4 Células Mononucleares do sangue periférico

As voluntárias foram recrutadas por meio de rede social e indicação, mulheres gestantes e não gestantes para participarem da pesquisa. As mesmas eram provenientes das regiões administrativas de todo o Distrito Federal (DF). Foram estudadas 15 mulheres, com idades entre 20 e 36 anos e dessas, 5 eram gestantes com até 20 semanas de gestação.

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foram coletados de cada voluntária 16 mL de sangue venoso em tubo vacutainer estéril com EDTA. O sangue era completado para 20 mL com salina tamponada com fosfato (STF) gelada. O sangue era gentilmente colocado sobre um gradiente de Percoll (Sigma,USA), densidade 1,077, e centrifugado a 750g por 15 min, 4°C na proporção de 3 mL de Percoll para cada 5 mL de sangue. As células mononucleares (CMN) recuperadas eram ressuspensas em 10 mL de STF gelada e centrifugada a 400g por 10 min, a 4°C, para retirar o Percoll. Após o sobrenadante ser desprezado, as células eram novamente ressuspensas em 10 mL de STF gelada e centrifugadas a 200g, por 10 min, a 4°C, para retirar as plaquetas. Desprezava-se o sobrenadante e ressuspendia-se as CMN em 2 mL de RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) incompleto. As células eram quantificadas em câmara de Neubauer e a viabilidade era determinada pela exclusão da nigrosina e foi sempre superior 95%. As células eram mantidas refrigeradas durante todo o procedimento. As CMN, em uma suspensão contendo 5×10^4 em um volume de 50 μ L de meio incompleto, eram distribuídas por escavação em placas de 96 escavações (TTP, Trasadingen, Switzerland), estéreis, de fundo chato. As placas eram incubadas em câmara úmida a 37°C, em 5% de CO₂ em ar, por 30 min, para as células baixarem ao fundo da placa. Transcorrido esse período, as

preparações eram lavadas 2 vezes com STF para retirar as células não aderentes. As células obtidas eram utilizadas nos testes abaixo descritos.

3.4 Grupos do estudo

Os experimentos ocorreram em dois tipos celulares distintos: células de linhagem neuroblastoma SK e células mononucleares do sangue periférico, obtidas pela separação em gradiente de densidade em Percoll.

Foram feitos 5 cultivos independentes de neuroblastoma, embora a origem celular seja a mesma.

Para obtenção das células mononucleares, as voluntárias foram separadas em dois grupos (5 voluntárias por grupo): 1) grupo gestantes; 2) grupo não gestantes.

Critérios de inclusão:

Gestantes até o segundo trimestre de gestação, saudáveis entre 20 e 40 anos, com IMC dentro da normalidade. Mulheres não gestantes controles normais entre 20 e 40 anos, saudáveis. Pareadas por idade com as mulheres gestantes, com IMC dentro da normalidade.

Critérios de exclusão:

Gestantes ou controles em uso de medicamentos, consumo excessivo de álcool, fumantes, hábitos alimentares inadequados. Com o IMC fora da normalidade para a idade, pois a obesidade pode ser fator determinante de inflamação.

Para avaliar as funções do sistema imunitário e a via do NF- κ B as amostras sanguíneas foram coletadas em tubo de coleta a vácuo, com anticoagulante (EDTA), mantidas refrigeradas e utilizados até no máximo 4 horas após a coleta. Para avaliarmos a influência dos tratamentos nas células infectadas in vitro com o vírus Zika, 5 voluntárias foram estudadas por grupo e as coletas foram feitas até o segundo trimestre de gestação do grupo gestante. As mesmas determinações foram feitas nas mulheres não gestantes. As citocinas foram determinadas nos sobrenadantes das culturas nas placas de cultura dos testes que avaliaram as moléculas da via do NF- κ B, após 6 horas do início do tratamento ou não com as drogas.

3.4.1 Grupos de estudo para avaliação das moléculas da via do NFkB e produção de citocinas pelos neuroblastomas e pelas células mononucleares do sangue periférico

Foram utilizados oito grupos para avaliar a influência do tratamento do atazanavir, da curcumina e do lopinavir nas funções *in vitro* dos neuroblastomas SK, infectados ou não com ZKV. Os grupos criados foram:

Controles (Cont), grupo onde não houve a incubação com o vírus Zika e não recebeu tratamento com as drogas.

ZIKA Vírus (ZKV), grupo incubado com o vírus Zika, mas que não recebeu tratamento com as drogas.

Curcumina (Curc), grupo não incubado com o vírus Zika e tratado com a curcumina.

ZKV e Curcumina (ZKV+Curc), grupo incubado o vírus Zika e tratado com curcumina.

Atazanavir (Ataz), grupo não incubado com o vírus Zika e tratado com o atazanavir.

Atazanavir (ZKV+ATAZ), grupo incubado com o vírus Zika e tratado com o atazanavir.

Lopinavir (Lopi), grupo não incubado com o vírus Zika e tratado com o lopinavir.

ZKV e Lopinavir (ZKV+Lopi), grupo incubado com o vírus Zika e tratado com lopinavir.

Cada grupo consistiu em 5 cultivos de neuroblastomas, proveniente de 5 a 10 passagens.

Para as gestantes e não gestantes foram criados os mesmos grupos, sendo diferenciados pela letra G para indicação dos grupos de que se tratava das gestantes:

Controles (Cont), grupo de células de não gestantes no qual não houve a incubação com o vírus Zika e não recebeu o tratamento com as drogas.

ZIKA Vírus (ZKV), grupo de células de não gestantes no qual houve a incubação com o vírus Zika e não recebeu tratamento com as drogas.

Curcumina (Curc), grupo de células de não gestantes no qual não houve a incubação com o vírus zika e recebeu tratamento com a curcumina.

ZKV e Curcumina (ZKV+Curc), grupo de células de não gestantes no qual houve a incubação com o vírus Zika e recebeu tratamento com a curcumina.

Atazanavir (Ataz), grupo de células de não gestantes no qual não houve incubação com o vírus Zika e recebeu tratamento com o atazanavir.

Atazanavir (ZKV+ATAZ), grupo de células de não gestantes no qual houve a incubação com o vírus zika e recebeu tratamento com o atazanavir.

Lopinavir (Lopi), grupo de células de não gestantes no qual não houve a incubação com o vírus Zika e recebeu tratamento com lopinavir.

ZKV e Lopinavir (ZKV+Lopi), grupo de células de não gestantes no qual houve incubação com o vírus zika e recebeu tratamento com lopinavir.

Controles (Cont G), grupo de células de gestantes no qual não houve incubação com o vírus Zika e não recebeu tratamento com as drogas.

ZIKA Vírus (ZKV G), grupo de células de gestantes no qual houve incubação com o vírus zika e não recebeu tratamento com as drogas.

Curcumina (Curc), grupo de células de gestantes no qual não houve incubação com o vírus Zika e recebeu o tratamento com a curcumina.

ZKV e Curcumina (ZKV+Curc G), grupo de células de gestantes no qual houve incubação com o vírus Zika e recebeu o tratamento com curcumina.

Atazanavir (Ataz G), grupo de células de gestantes no qual não houve incubação com o vírus zika e recebeu o tratamento com o atazanavir.

Atazanavir (ZKV+ATAZ G), grupo de células de gestantes no qual houve incubação com o vírus Zika e recebeu o tratamento com o atazanavir.

Lopinavir (Lopi), grupo de células de gestantes no qual não houve incubação com o vírus Zika e recebeu o tratamento com lopinavir.

ZKV e Lopinavir (ZKV+Lopi G), grupo de células de gestantes no qual houve incubação com o vírus Zika e recebeu o tratamento com lopinavir.

Cada grupo contou com a amostra de 5 doadoras.

Para verificar se as modificações induzidas pelo vírus e o tratamento das células mononucleares do sangue periférico com as drogas na produção de citocinas mantinham-se com o tempo, a expressão das citocinas pelas células mononucleares do sangue periférico ao longo de um período de incubação por 4 dias foi avaliada uma vez por dia no sobrenadante das culturas. Para realização dos experimentos de avaliação da cinética de citocinas foram estudadas 5 doadoras não gestantes, e foram formados os seguintes 4 grupos:

ZIKA Vírus (ZKV), grupo de células de não gestantes no qual houve a incubação com o vírus Zika e não recebeu tratamento com as drogas.

ZKV e Curcumina (ZKV+Curc), grupo de células de não gestantes no qual houve a incubação com o vírus Zika e recebeu tratamento com a curcumina.

Atazanavir (ZKV+ATAZ), grupo de células de não gestantes no qual houve a incubação com o vírus Zika e recebeu tratamento com o atazanavir.

ZKV e Lopinavir (ZKV+Lopi), grupo de células de não gestantes no qual houve incubação com o vírus Zika e recebeu tratamento com lopinavir.

As normas éticas de pesquisa científica com seres humanos foram rigorosamente obedecidas e o presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília – UnB (processo: 61278316.4.0000.5558). O sangue das voluntárias foi coletado apenas após a assinatura do termo de conhecimento livre e esclarecido.

3.5 Vírus Zika

Uma alíquota contendo o vírus Zika (ZIKV PE 243) foi doada pelo pesquisador Dr Alexandre Vieira Machado, da FIOCRUZ- MG. A multiplicação do vírus foi feita nas Células C6/36, por 6 dias. A cultura foi centrifugada e do sobrenadante foram feitas as alíquotas de 100 µl, que foram congeladas em freezer -80°. Duas dessas alíquotas foram tituladas e o valor obtido foi de $1,9 \times 10^6$ Pfu/mL. O índice de multiplicidade de infecção (MOI) utilizado foi de 0,1, ou seja, 1 partícula viral para 10 células. A suspensão viral foi colocada no volume de 50µL, do meio para cada célula, por poço, e as placas eram incubadas em câmara úmida a 37°C, em 5% de CO₂ em ar, por 30 minutos, para adsorção do vírus pelas células.

3.5.1 Titulação

A titulação do vírus foi feita pela quantificação de células Vero infectadas. Após alcançada a confluência de aproximadamente 80% das células Vero em cultivo, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e $2,5 \times 10^5$ células foram distribuídas por poço, em placas de 6 poços. Após 24 horas em multiplicação na estufa de CO₂ (5%), a 37°C, em meio DMEM, pH 7.2, foi estimado que as células estavam em uma concentração de 5×10^5 , pois a dinâmica de crescimento dessa linhagem é de dobrar sua quantidade a cada 24 horas. Paralelamente foi feita uma diluição seriada de cada alíquota do vírus, em duplicata para confirmação do título. Em 5 microtubos foram colocados 450µl de meio DMEM (Gibco) sem SFB e da alíquota do vírus foram retirados 50µl e colocado em sequência em cada um dos tubos, conforme a figura abaixo (Figura 9).

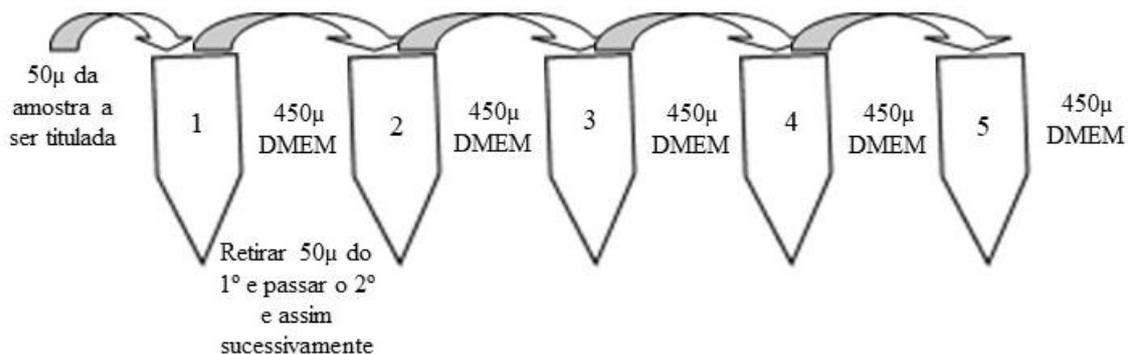


Figura 9- Diluição seriada para titulação viral.

A placa com as células Vero aderidas foi lavada com PBS, 37°C, despejando o líquido na parede, e movimentando lentamente e delicadamente, depois o sobrenadante foi descartado. A diluição seriada do vírus foi colocada na placa, colocando no poço zero apenas DMEM. O tubo 1 foi colocado no poço com a identificação de -1 e assim sucessivamente. O volume colocado em cada poço foi de 400μl da suspensão viral (Figura 10).

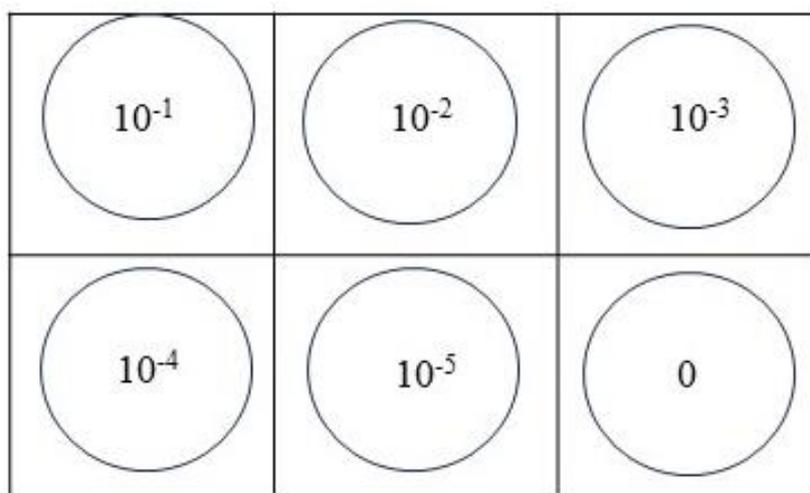


Figura 10- Esquema da placa com identificação das diluições.

Homogeneizou-se a placa agitando delicadamente de um lado para outro e permitiu-se a adsorção do vírus por 1 hora, 37°C, 5% de CO₂ e agitou-se lentamente a cada 15 min. Após, foi adicionado em cada poço, 3ml de meio semissólidos carboximetilcelulose (CMC) a 2%, e a placa foi mantida em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, por 6 dias, com controle diário de mudanças de pH e contaminação. No sexto dia, a placa foi fixada com paraformaldeído overnight e depois lavada em água corrente, corada com cristal violeta por 15 min e em seguida lavada com uma pisseta, permitido

secar espontaneamente, e em seguida quantificados pela presença de áreas circulares de luscência. O valor foi obtido pela multiplicação do total de áreas translúcidas pelo inverso da diluição e pelo fator de correção da diluição, e o resultado expresso em unidades formadoras de placas por ml (PFU/ml).

Para o cálculo do número de unidades formadoras de placas foram multiplicados o número de áreas translúcidas (como indicado pelas setas brancas na figura 11) pelo inverso da diluição do poço em que foram contadas essas áreas (por ex 10^{-4}) pela diluição (fator de correção da diluição, por ex, como foi feita a adsorção em $400\mu\text{L}$, dividiu-se 1000 por 400 e obtivemos 2,5.

O número de unidades formadoras de colônia/ml é igual ao número de áreas translúcidas X inverso da diluição do poço em que foram contadas X diluição, $76 \times 10^4 \times 2,5 = 1,9 \times 10^6$ PFU/ml

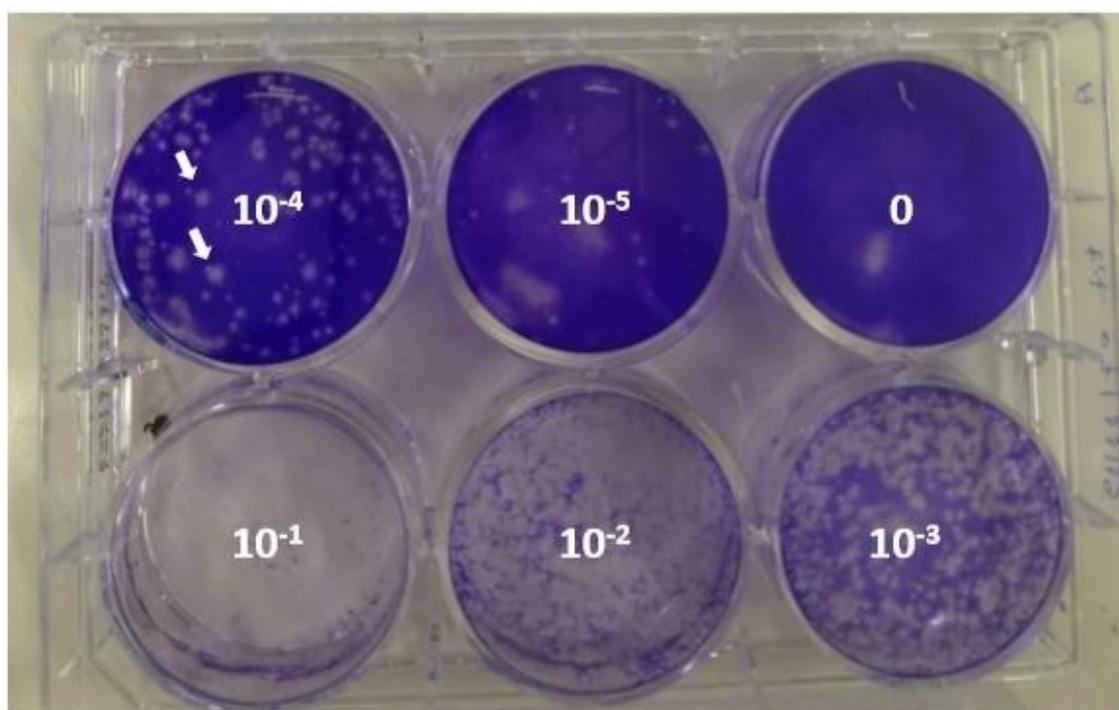


Figura 11- Imagem representativa de placa de titulação do vírus Zika.

3.6 Avaliação da infecção dos neuroblastomas pelo vírus Zika por microscopia eletrônica de transmissão

Do cultivo de neuroblastomas, realizado como descrito no item 4.3.3, foram utilizados 1×10^7 células para a execução da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Os neuroblastomas foram incubados com o vírus Zika (MOI 1) por 4 horas, e então foram

retiradas da garrafa de cultura e o material centrifugado a 170 G por 5 min para obtenção do *pellet* para a microscopia eletrônica.

A amostra foi fixada com fixador Karnovsky (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose, 5mM de CaCl₂ em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2) por 24 horas e em seguida, lavada 2x com tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 (15 minutos cada etapa). No momento da pós-fixação a amostra passou uma hora em tubo de 1,5 mL com tetróxido de ósmio + ferricianeto de potássio, na concentração 1:1. Após, o material foi lavado com água destilada, por duas vezes e após isso seguiu a etapa de desidratação com gradientes de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100%), por 8 minutos em cada uma das etapas. Em seguida, foi realizada a infiltração gradual de resina Spurr, substituindo a acetona na proporção seguindo respectivamente, 2:1 (6 horas ou overnight), 1:1 (6 horas), 1:2 (6 horas ou overnight) e resina pura por até 6 horas. No momento de emblocar o material, foi deixado em resina pura, em tubo de 1,5 mL, na estufa a 65°C por 48 horas. Por fim, realizou-se os cortes semifinos, com 5 µm de espessura e corou-se o material com azul de toluidina para escolha das regiões de interesse. Depois de cortes ultrafinos de 50 nm, com ultramicrotomo EM UC7 (Leica, Alemanha) colocou-se sobre telas de cobre de 300 *mesh*, os quais foram contrastados com acetato de uranila a 3% por 10 minutos. O Material foi analisado em microscopia eletrônica de transmissão (MET) em microscópio Jeol 1011 (Jeol, Japão). As imagens foram obtidas no Instituto de Biologia-UnB.

3.7 Tratamento com Atazanavir, Curcumina e Lopinavir

Para definir as doses e o tempo de incubação mínimo com as drogas estudadas, foram analisados os dados da literatura de farmacocinética das drogas, onde encontramos o pico sérico alcançado no sangue periférico de mulheres gestantes e tempo mínimo em que essas drogas o atingiu. Como também fizemos testes iniciais de padronização.

O pico sérico do atazanavir para gestantes no 2º trimestre de gestação é de 3078,85 ng/mL, alcançado em média 2,7 horas após a administração (Ministério da Saúde, 2021). O artigo de Mounce, 2017, foi utilizado para determinar a dose de curcumina de 5µM, ou seja 0,0018419g/L em 2 horas, dose que se mostrou eficaz em combater a infecção viral de Zika *in vitro*. Para o lopinavir foi encontrado que a concentração máxima obtida no soro de mulheres gestantes no 2º trimestre de gravidez foi de 8,4µg/mL, no tempo de 4 horas após a administração (Best, 2010). Baseado nesses dados utilizamos 0,00062mg/200µL para o atazanavir (0,00037mg/ 200µL para a curcumina e 0,0017mg/200µL para o lopinavir. Todas as apresentações utilizadas no

estudo eram em pó e foram diluídos em 1mL de meio de cultura RPMI com 10% de DMSO e 10% de soro fetal bovino.

Para definição de tempo de tratamento ficou estabelecido o período de 6 horas, pois nesse tempo ainda era mantida a viabilidade das células e a ativação da via do NF- κ B já teria iniciado. Nos outros períodos avaliados nos experimentos pilotos de padronização a viabilidade celular não era mantida em nível necessário para realização dos experimentos de citometria de fluxo, para o qual a medição de fluorescência é feita na célula intacta, o que não seria possível, pois, após esse período já havia grande destruição de células pelo vírus Zika.

3.8 Avaliação da morte do vírus Zika em células C6/36 para determinação de tempo de infecção nos testes

Para padronizar a quantidade de vírus e o tempo em que as culturas ficariam expostas à infecção e ao tratamento, foram feitos 2 experimentos com 3 e 5 culturas de células C6/36 infectadas com MOI 1 e MOI 0,1 e que receberam tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir, nos tempos de 3, 6, 12 e 24 horas. Nesses períodos foram colhidos 300 μ L do sobrenadante e feita a posterior titulação em células Vero. Por esses experimentos, observamos que com o MOI 1, o vírus causou a destruição das células, o que não é viável para o tipo de experimento proposto por citometria. Os testes com o MOI 0,1 mostraram melhores resultados no tempo de 3 e 6 horas, e nos outros também ocorreu uma grande destruição celular. Como foi verificado na literatura, a via do NF- κ B já está ativada com 6 horas de infecção e por isso o tempo de 6 horas foi definido para realização dos testes.

3.8.1 Inibição direta do crescimento do vírus Zika pelo atazanavir, curcumina e lopinavir

Para verificar a inibição direta do vírus Zika pelas drogas atazanavir, curcumina e lopinavir, as culturas foram expostas à infecção e ao tratamento. Foram utilizadas 6 culturas de células C6/36 infectadas com MOI 0,1 e que receberam tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir, nas concentrações citadas no ítem 3.7, nos tempos de 6, 24, 48 e 96 horas. Nesses períodos foram colhidos 300 μ L do sobrenadante e feita a posterior titulação em células Vero.

3.9 Cinética de produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes, incubadas com o vírus Zika e tratadas ou não com atazanavir, curcumina e lopinavir

Para avaliar o efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir sobre a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico de mulheres gestantes ou não, foram coletados 10ml de sangue em tubo de coleta a vácuo heparinizado e feita a separação em gradiente de densidade com Percoll, densidade 1,077, conforme descrito acima (item 4.3.4). Essas células foram distribuídas em placas de 6 poços, na quantidade de $2,5 \times 10^5$ /poço em 1,5ml de meio RPMI incompleto (com bicarbonato de sódio) e colocadas para incubar por 1 hora para aderência e ao fim a placa foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionadas em cada poço 1ml de meio contendo $2,5 \times 10^4$ /poço de partículas virais e incubadas por 1 hora para adsorção viral. Decorrido esse período, os poços receberam os respectivos tratamentos, com atazanavir, curcumina e lopinavir diluídos em 2ml de meio RPMI completo com soro fetal bovino, totalizando 3 ml em cada poço. Nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas foram coletados 300 μ L dos sobrenadantes de cada poço, que foi congelado à - 80°C, para posterior avaliação da produção de citocinas imunes e inflamatórias, sendo descongelado apenas uma vez.

3.10 Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão dos receptores para o TNF- α e das moléculas das vias canônica e não canônica do NF- κ B nos neuroblastomas e nas células mononucleares do sangue periférico incubadas ou não com o vírus Zika

Para avaliar o tipo de ativação das vias do NF- κ B na infecção pelo vírus Zika e verificar se alguns dos tratamentos realizados poderiam alterar a via de ativação, foram feitas marcações a partir dos 3 receptores para o TNF- α e linfotóxina na superfície da célula até as moléculas finais da via. A via do NF- κ B pode ser ativada diretamente por antígenos originados dos microrganismos por meio de receptores para padrões moleculares de patógenos ou outros receptores celulares. Em resposta a esse estímulo há a produção da citocina inflamatório TNF- α , que normalmente é benéfica ao sistema imune se sua produção for adequadamente controlada. A via do NF- κ B pode também ser

ativada pelas próprias citocinas produzidas, como o fator de necrose tumoral. Dependendo do estímulo e das bases genéticas do indivíduo pode culminar na ativação da via canônica ou não canônica, o que determinará se haverá a produção de citocinas inflamatórias, morte celular ou proliferação.

Avaliou-se os efeitos dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão de receptores para o TNF, receptor 1 TNF (r1 TNF) e receptor 2 TNF (r2 TNF) e do receptor para linfotoxina (rLTX). E ainda, o efeito desses tratamentos sobre a expressão das moléculas coadaptadoras FADD e TRAFF; na expressão das moléculas JNK, NIK e I κ B e nas moléculas finais das vias do NF- κ B: relA (p65), relB, c-Rel, p50 e p52 nas células de linhagem neuroblastoma SK-N-BE (2) e de células mononucleares do sangue periférico de gestantes e não gestantes, infectados ou não com o vírus Zika.

Os neuroblastomas obtidos de acordo com o item 4.3.3. e as células mononucleares como descrito no item 4.3.4, foram incubadas por 1 hora na presença do vírus ou não, para adsorção do vírus. Os poços que não eram infectados com o vírus, foram incubados por igual período apenas com o meio da respectiva célula. Transcorrido a etapa de adsorção, os poços receberam 150 μ L do atazanavir, curcumina ou lopinavir e os poços que não receberam o tratamento foram completados para o volume de 200 μ L com meio de cultura das células. As placas foram incubadas por 6 horas. Ao fim do tratamento, as placas foram centrifugadas e os sobrenadantes coletados para realização das dosagens das citocinas.

As células que permaneceram nas placas foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (STF) e incubadas por 10 minutos com solução tampão STF/EDTA gelado (20 mM de EDTA) e depois centrifugadas. Foi feita mais uma lavagem com STF-BSA (STF + 0,5% de BSA + 0,1% de azida sódica) e em seguida, as células mononucleares do sangue periférico foram incubadas por 1 hora com o marcador de monócito CD14 APC (APC Mouse Anti-Human, BD Pharmingen), na diluição 1:100 em 50 μ L de STF. Os neuroblastomas não tiveram essa marcação, por serem provenientes de cultivo de linhagem específica e não terem outros tipos celulares no meio. Após, as células foram lavadas duas vezes com STF por centrifugação a 200g por 5 min e as placas destinadas as respectivas marcações com os anticorpos, todos na diluição de 1:100 em 50 μ L de STF.

Nos poços das placas destinados ao receptor 1 de superfície da célula para o TNF- α , foram adicionados o anticorpo monoclonal anti-r1-TNF de camundongo (r1-TNF Anticorpo (H-5); sc-8436, Santa Cruz Biotechnology), já acoplado com o fluorocromo

isotiocianato de fluoresceína (FITC) e incubados por 1 hora. As células foram então lavadas duas vezes com STF e suspensas em um volume final de 200 µL de STF com 1% de albumina bovina.

Aos poços das placas destinados aos receptores de superfície rLTX e r2TNF foram adicionados os anticorpos monoclonais de camundongo anti-LTβR (LTβR Anticorpo (H-2); sc-398929, Santa Cruz Biotechnology), ou o anticorpo monoclonal de camundongo anti-r2TNF (TNF-R2 anticorpo (D-2); sc-8041, Santa Cruz Biotechnology e incubadas por 2 horas, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas duas vezes com STF e foram incubadas novamente por 1h à temperatura ambiente, respectivamente com os seguintes anticorpos secundários: IgG1-FITC (FITC Mouse IgG, k Isotype Control, sc55616 BD Pharmingen) para LTXR e IgG2B-FITC (FITC Rat Anti-Mouse IgG2b; sc-553395, BD Pharmingen) para r2-TNF, diluídos em 50 µL de STF, e então foram lavadas duas vezes.

Para a análise da expressão das moléculas p50, p52, p65 (relA), IκB e JNK foram acrescentadas etapas adicionais, pois são moléculas intracelulares, para as quais foram acrescentadas as etapas de fixação e permeabilização das células. Após a lavagem das placas marcadas com o CD-14 APC ou das placas que não tiveram essa marcação (neuroblastoma), as células foram incubadas com formaldeído a 2% para fixação, por 15 min em temperatura ambiente e lavadas duas vezes com 150 µL de Tween 20 a 0,2 % em STF, por centrifugação a 200 g por 5 min. O Tween é um detergente que mantém os poros abertos na etapa de permeabilização. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 150 µL de saponina 0,2 % em STF, por 20 min em temperatura ambiente e lavadas 2 vezes com Tween. Após esse procedimento, foi realizado o bloqueio com 150 µL de solução de STF com 1% de albumina bovina por 20 min e lavadas 2 vezes com Tween. Em seguida procedeu-se com a marcação com os anticorpos monoclonais anti-p50 (NF-κB p50 Anticorpo(E-10) Alexa Fluor® 488, sc-8414 AF488, Santa Cruz Biotechnology), esse anticorpo foi utilizado apenas para marcação dos neuroblastomas, pois para as células mononucleares do sangue periférico foi utilizado o anticorpo fosforilado, anti-p52 (NFκB p52 Anticorpo (C-5) Alexa Fluor® 488, sc-7386), anti-p65 (relA) (NFκB p65 Anticorpo (F-6) Alexa Fluor® 488, sc-8008, Santa Cruz Biotechnology), anti-p-IκB-a (p-IκB-a Anticorpo (B-9): sc-8404, Alexa Fluor® 488), e anti-JNK, acoplado com o fluorocromo FITC (p-JNK (G-7); sc-6254 Santa Cruz Biotechnology Inc.), numa diluição de 1:100 em 50 µL de STF contendo 0,05 de saponina, por 12 horas, a 4°C. Após esse

período de incubação, as placas foram lavadas duas vezes com Tween, 1 vez em STF BSA e suspensas em um volume final de 200 μ L de STF BSA.

Para a marcação das moléculas p50 fosforiladas, utilizada para as células mononucleares, e para o relB, TRAF, FADD, NIK e c-Rel, em seguida aos procedimentos anteriores, foram a seguir incubadas com o anticorpo secundário marcado com fluorocromo. A molécula c-Rel, nos experimentos com os neuroblastomas, foi marcado com o anticorpo policlonal anti-c-Rel (c-Rel Anticorpo (N): sc-70, Santa Cruz Biotechnology) e seu anticorpo secundário (anticorpo secundário IgG anti-coelho de cabra (H+L), acoplado com APC, 4050-11L, Southern Biotech). Já para as células mononucleares foi utilizado para o c-Rel o anti-c-Rel (sc-365720 E1517, Santa Cruz Biotechnology), sendo que para o c-Rel foi utilizado o mesmo anticorpo secundário que foi utilizado para as moléculas TRAF e relB, o que permitiu análise de sua expressão junto com o marcador de monócitos CD14 APC e o anti-p50 fosforilado (p-NF κ B p50 Anticorpo(A-8) Alexa Fluor® 488, sc-271908 H1720, Santa Cruz Biotechnology). As células foram fixadas com formaldeído a 2%, permeabilizadas com saponina, seguido pelo bloqueio da reação. As placas foram incubadas com os anticorpos primários, sendo, anticorpo monoclonal anti-p68 (relB) (relB Anticorpo (C-4) sc-48379, Santa Cruz Biotechnology), anticorpo monoclonal anti-TRAF (TRAF2 Anticorpo (F-2): sc-136999 Santa Cruz Biotechnology), anticorpo monoclonal anti-FADD, (FADD Anticorpo (G-4): sc271748, Santa Cruz Biotechnology), anticorpo policlonal anti-NIK (NIK Anticorpo (A-12); sc8417, Santa Cruz Biotechnology), numa diluição de 1:100 em 50 μ L de STF contendo 0,05% de saponina, por 12 horas, a 4°C. Após incubação, os poços foram lavados duas vezes com Tween e incubados novamente por 1 h, em temperatura ambiente, com os anticorpos secundários, sendo o IgG2B-FITC (FITC Rart Anti-Mouse IgG2b sc-553395, BD Pharmingen) para FADD e NIK, IgG1-FITC (FITC Mouse IgG, k Isotype Control, sc55616 BD Pharmingen) para TRAF, RelB e C-REL e IgG2a (Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse (γ 2a), Invitrogen) para a p50 fosforilada, numa diluição de 1:100, em 50 μ L de STF com 0,05% de saponina. Em seguida foram lavadas duas vezes em STF BSA e suspensas em um volume final de 200 μ L de STF BSA.

A intensidade de fluorescência em cada amostra foi capturada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa Diva versão 7 (BD Bioscience) e os dados foram avaliados utilizando o programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, EUA). Para calibração das leituras no citômetro foram utilizadas células não marcadas, não estimuladas e não tratadas com atazanavir, curcumina e lopinavir, mas que passaram

pelos mesmos processos de lavagem e centrifugação, de acordo com cada protocolo, já que durante a execução dos pilotos foi observado que as células que passaram por tantas etapas poderiam sofrer variações em seu tamanho e granulosidade.

3.11 Avaliação da produção de citocinas e quimiocinas pelos neuroblastomas e pelas células mononucleares do sangue periférico incubadas ou não com o vírus Zika e tratados ou não com atazanavir, curcumina e lopinavir

Para a avaliar a produção dessas citocinas foram utilizados os kits CBA, que utiliza *beads* conjugadas com o anticorpo de captura, os quais se ligam às citocinas/quimiocinas. Cada tipo de *bead* possui diferente intensidade de fluorescência, assim, diversos tipos de citocinas podem ser analisados simultaneamente no citômetro de fluxo. Os três kits utilizados foram o inflamatório, BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit utilizado para avaliar quantitativamente Interleucina-8 (IL-8), Interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina-12p70 (IL-12p70) em uma única amostra. O kit imune, BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine, para avaliar quantitativamente interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interferon-gama (INF γ) e interleucina 17A (IL-17A) em uma única amostra e o kit para quimiocinas BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit, para avaliar quantitativamente Interleucina-8 (CXCL8/IL-8), RANTES (CCL5/RANTES), Monocina induzida por Interferon- γ (CXCL9/MIG), Proteína Quimioatraente de Monócitos-1 (CCL2/MCP-1) e Interferon- γ induzido pela Proteína-10 (CXCL10/IP-10) em uma única amostra.

Os protocolos seguiram as instruções do fabricante.

As citocinas foram avaliadas no sobrenadante das culturas provenientes dos testes realizados nos itens 4.7 e 4.8, dos neuroblastomas e das células mononucleares do sangue periférico de gestantes e não gestantes, dos 8 grupos de estudo.

Os kits foram otimizados para atender um número maior de amostras, mas que garantiu a execução ideal das análises. As amostras (16,7 μ L) foram incubadas com as *beads* de captura (16,7 μ L) e o reagente de detecção (16,7 μ L). Simultaneamente à

dosagem das amostras, foi preparada uma curva de calibração, a partir de uma diluição na proporção de 1/2 de um padrão contendo 5.000 pg/ml de cada citocina.

A aquisição em cada amostra foi realizada no citômetro de fluxo BD LRS II FORTESSA utilizando o programa Diva versão 7 (BD Bioscience). A estratégia de detecção utilizou o template comercial do CBA previamente programado no citômetro no qual os sinais de FSC, SSC, PE e APC foram programados utilizando beads de calibração (*set up*). Para cada amostra e padrões da curva foram adquiridos 1800 eventos para o kit inflamatório e 2.100 eventos para o kit imune. Os dados obtidos foram tratados no programa FCAP array versão 3 (BD Bioscience) utilizando a curva de calibração para calcular a quantidade em pg/mL das citocinas de cada amostra.

Foram considerados os limites de detecção para cada citocina analisada determinado pelo fabricante. Os valores que deram leitura abaixo dos limites de detecção foram considerados zero para fins de análise. Os valores considerados foram: a) Para o kit imune: TNF < 3,8 pg/mL; IL-6 < 2,4 pg/mL; IFN- γ < 3,7 pg/mL; IL-12p70 < 10,7 pg/mL; IL-2 < 2,6 pg/mL; IL-10 < 4,5 pg/mL; IL-4 < 4,9 pg/mL; IL-17A < 18,9 pg/mL; b) Para o kit inflamatório: IL-8 < 3,6 pg/mL; IL-1 β < 7,2 pg/mL; IL-6 < 2,5 pg/mL; IL-10 < 3,3 pg/mL; TNF < 3,7 pg/mL; IL-12p70 < 1,9 pg/mL; c) Para o kit de quimiocinas: CXCL8/IL-8 < 0,2 pg/mL; RANTES < 1,0 pg/mL; CXCL9/MIG < 2,5 pg/mL; CCL2/MCP-1 < 2,7 pg/mL e CXCL10/IP-10 < 2,8 pg/mL.

3.12 Estratégias para leitura no citômetro

Para aquisição das amostras dos experimentos realizados no item 4.8, foram adotadas as seguintes estratégias: a população de interesse foi selecionada através de um *gate* colocado em um gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade/complexidade (SSC) das células (figura 12A e 13A), visando excluir os debris e grumos celulares.

Para aquisição das amostras do neuroblastoma SK, a estratégia utilizada foi para detecção da população FITC+, que correspondia aos receptores para TNF e LTX e as moléculas da via do NF κ B. Foi feito um gráfico tipo *Dot* com linhas marcando os limites de início da fluorescência (figura 12B) e identificação da população FITC+ e um histograma para visualizar no eixo X até onde vai a população FITC- (figura 12C).

A estratégia utilizada para detecção por citometria de fluxo e a quantificação da proteína F4/80 para avaliar a expressão do receptor 1 TNF (r1 TNF), receptor 2 TNF (r2 TNF) e o receptor para linfotóxina (rLTX); da expressão das moléculas adaptadoras

FADD e TRAF; a expressão das moléculas JNK e NIK; a expressão do I κ B e a expressão de moléculas das vias canônica e não canônica do NF- κ B: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 e p52 está descrita abaixo.

Para aquisição das amostras de células mononucleares do sangue periférico foram feitas 2 marcações em cada poço, uma para APC (para identificação dos monócitos) e outra para FITC (para identificação do receptor ou molécula que foi marcado em cada poço). Após a seleção da população de interesse no gráfico de FSC por SSC, foi feito um gráfico *Dot* de APC por FITC, para localizar a população que não recebeu nenhuma das marcações (figura 13B). Em seguida foi feito um histograma para seleção da população de monócitos APC+ (figura 13C). Após esses ajustes, foi possível verificar que a população monócitos FITC+ estava localizada no eixo Y acima de 10^1 para o APC e no eixo X, acima de 10^2 para FITC (figura 13D). Para cada molécula foi feita uma padronização, pois as etapas dos protocolos poderiam ter ocasionado modificações nas células, não permitindo a aquisição de todas as amostras com o mesmo ajuste do aparelho. Todas as análises foram realizadas com a aquisição de 10 mil eventos e ponto de corte (*threshold*) de mil. Na tabela 1 constam os parâmetros e as voltagens utilizadas na aquisição das amostras.

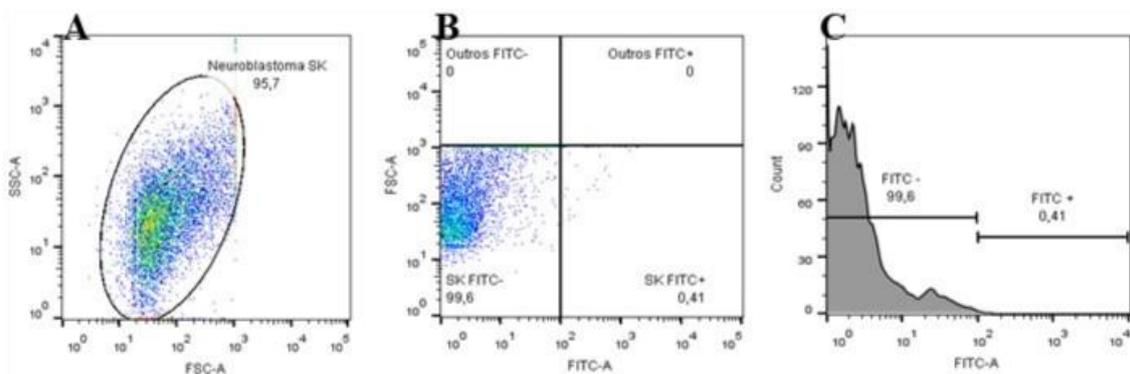


Figura 12- A: Seleção da população de interesse no gráfico de tamanho (FSC) por complexidade/granulosidade (SSC) dos neuroblastomas. B: Localização da população na menor emissão de fluorescência sem marcação em gráfico de FSC-A por FITC-A das células, C: histograma com a contagem de eventos (eixo Y) pela intensidade de fluorescência (eixo X), realizando a exclusão da fluorescência natural das amostras por meio da análise de células não-marcadas.

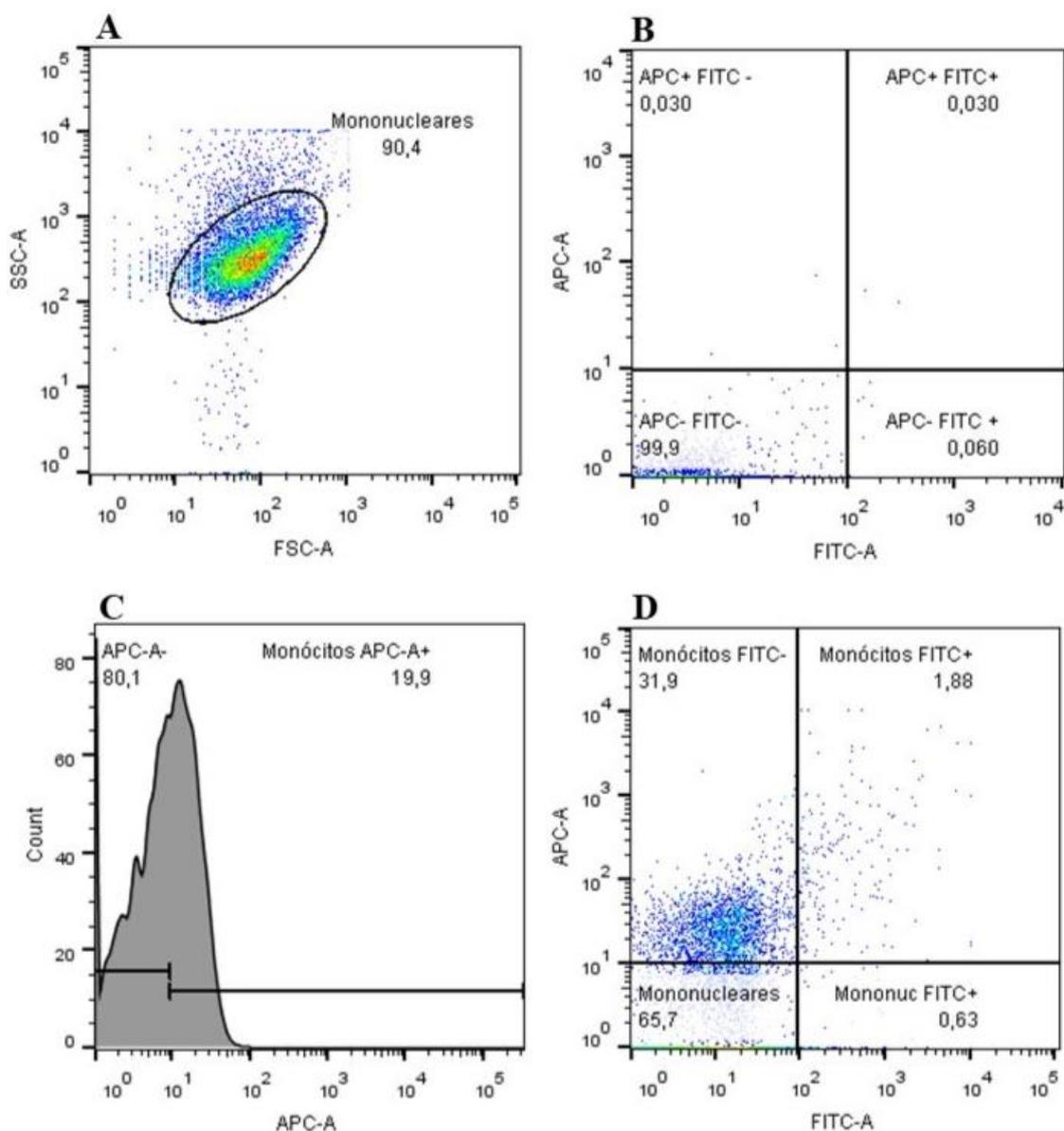


Figura 13- Seleção das células positivas para marcação dos monócitos. A- Seleção da população de células mononucleares; B- Localizando a população não marcada com os anticorpos. C- Histograma para seleção da população de monócitos CD14+ APC; D- Visualização das populações da amostra para definição dos marcados APC+ e FITC+.

Tabela 1- Parâmetros e voltagens utilizados na aquisição das amostras dos receptores e moléculas das vias do NF- κ B

Moléculas	Neuroblastomas				Monócitos			
	FSC	SSC	FITC	APC	FSC	SSC	FITC	APC
Parâmetro								
Voltagem								
r1TNF	588	225	462	----	588	346	462	460
r2TNF	588	225	462	----	599	346	527	769
rLTX	588	225	462	----	599	346	527	769
FADD	588	225	462	----	648	500	753	819

TRAF	588	225	462	----	632	601	510	550
NIK	588	225	462	----	632	601	510	550
JNK	588	225	462	----	632	286	490	555
IκB	588	225	462	----	632	286	490	555
relA	588	225	462	----	632	577	516	566
relB	588	225	462	----	648	500	753	819
c-Rel	670	279	----	687	489	258	478	582
p50	588	225	462	----	632	736	588	566
p52	588	225	462	----	632	286	490	555

3.13 Análises estatísticas

Foi avaliada a normalidade da distribuição das amostras pelo teste de Kolmogorov–Smirnov e feito o teste de Bartlett para comparar as variâncias entre as amostras. Para comparação entre mais do que dois grupos com distribuição normal e variâncias semelhantes foi utilizado o teste paramétrico de ANOVA seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. Quando os dados não apresentavam distribuição normal ou as variâncias das amostras eram diferentes foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para múltiplas comparações. Para comparação entre dois grupos independentes foi feito o teste *t* de Student para amostras com distribuição normal e o teste de Mann-Whitney para aquelas que não tiverem distribuição normal.

Para comparação entre amostras pareadas de mais do que dois grupos com distribuição normal foi utilizado o teste de ANOVA para amostras pareadas seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações e para as amostras pareadas cuja distribuição não foi normal foi utilizado o teste de Friedmann seguido pelo teste de Dunn para comparação múltipla. Quando a comparação foi feita entre dois grupos pareados foi utilizado o teste *t* pareado ou o teste de Wilcoxon para amostras com distribuição normal ou não normal respectivamente.

A comparação entre as variáveis foi considerada estatisticamente significativa quando a diferença probabilística bicaudal de ocorrência devida ao acaso foi menor do que 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas e as apresentações gráficas dos dados foram feitas utilizando o programa Prism, versão 5 (GraphPad, Software, Inc., USA, 2005).

RESULTADOS

Para o estudo foram selecionadas 15 voluntárias saudáveis para os testes dos receptores do TNF e linfotóxina, moléculas das vias do NF-κB, avaliação da produção de citocinas e para a cinética de citocinas. Destas, 5 foram do grupo de mulheres controle não gestantes, 5 do grupo de mulheres gestantes e outras 5 mulheres não gestantes foram estudadas para avaliação da cinética de citocinas. Na tabela 1 encontram-se os dados antropométricos das voluntárias estudadas (tabela 1).

Tabela 2- Dados antropométricos mulheres não gestantes ou gestantes estudadas.

Teste	Número de Indivíduos	Média ± DP Semanas de Gestação	Média ± DP de Idade (anos)	Média ± DP de peso (Kg)	Altura ± DP (M)	IMC ± DP
NFκB Gestante	5	15,8±4,87	28,8± 7,32	69,84± 12,88	1,65± 0,05	25,69±4,72
NFκB Controle	5	_____	26,8±5,72	63,6± 3,97	1,65± 0,04	23,30±1,11
Cinética de citocinas	5	_____	26,2±5,45	62,38±6,06	1,63± 0,05	24,9±3,12
Total	15	15,8±4,87	27,26±5,67	66,30±8,23	1,65±0,05	25,48±3,71

Os grupos de voluntárias que participaram deste trabalho tinham as seguintes características: no estudo da via do NF-κB, eram gestantes, com média de semana de gestação de 15,8±4,87, variando entre 10 e 20 semanas; com média de idade de 28,8± 7,32, variando entre 20 e 36 anos; e média do peso de 69,84± 12,88, variando entre 57,3 e 88; a média da altura foi de 1,65 ± 0,05, variando entre 1,59 e 1,72 m e com índice de massa corporal (IMC) médio de 25,69±4,72. Na tabela 2 constam os resultados dos exames das gestantes realizados até o dia da coleta sanguínea para utilização em nossos testes e elas apresentaram um perfil hematológico e bioquímico dentro dos limites da normalidade, sem evidências de infecções ou alterações metabólicas que pudessem comprometer a saúde materno-fetal. Esses resultados são compatíveis com os valores de referência dos leucócitos, plaquetas, glicemia e testes sorológicos em gestantes saudáveis. Além disso, as gestantes não apresentaram sinais de infecção urinária, uma das complicações mais comuns na gravidez, que pode causar parto prematuro, baixo peso ao nascer e sepse neonatal. As gestantes analisadas possuíam um bom estado de saúde e um baixo risco de complicações obstétricas.

Tabela 3- Resultados dos exames sorológicos das gestantes feitos no acompanhamento pré-natal.

Gestante	1	2	3	4	5
Exame					

Leucócitos	12460	8215	6530	5950	7522
Plaquetas	375000	254000	250000	223000	205000
Glicemia	75	89	90	80	75
HIV	NR	NR	NR	NR	NR
VDRL	NR	NR	NR	NR	NR
Hepatite C	NR	NR	NR	NR	NR
Hepatite B	NR	NR	NR	NR	NR
Rubeola	NR	NR	NR	NR	NR
Toxoplasmose	NR	NR	NR	NR	NR
CMV	NR	NR	NR	NR	NR
EAS	NG	NG	NG	NG	NG
Urocultura	NG	NG	NG	NG	NG

NR = não reagente, NG = negativo

O grupo controle, contou com mulheres saudáveis, com média de idade de $26,8 \pm 5,72$, variando entre 22 e 34 anos; e média do peso de $63,6 \pm 3,97$, variando entre 57 e 67; a média da altura foi de $1,65 \pm 0,04$, variando entre 1,59 e 1,7 m e com índice de massa corporal (IMC) médio de $23,30 \pm 1,11$.

Dentre os participantes nas quais foi avaliada a cinética de citocinas, eram mulheres, com idade média de $26,2 \pm 5,45$, variando entre 21 e 34 anos; média de peso de $62,38 \pm 6,06$, variando entre 60 a 70 kg; média de altura de $1,63 \pm 0,05$, variando entre 1,54 a 1,67 m e com a média do índice de massa corporal (IMC) de $25,48 \pm 3,12$.

4.1 Inibição direta do crescimento do vírus Zika pelo atazanavir, curcumina e lopinavir

Com o objetivo de avaliar a influência das drogas atazanavir, curcumina e lopinavir no crescimento viral em células C6/36, foram quantificadas por titulação, amostras coletadas em 4 períodos, nos tempos de 6h, 24h, 48h e 96 horas após o início do tratamento com as drogas.

No grupo controle (incubado apenas com Zika) (figura 14A), houve aumento acentuada no crescimento do vírus entre os períodos de 6h *versus* 24h (teste t pareado, $p = 0,0003$), 6h *versus* 48h (teste t pareado, $p = 0,0040$), 24h *versus* 48h (teste t pareado, $p = 0,00040$). No grupo atazanavir (droga+vírus) (figura 14B), houve redução no crescimento do vírus entre os períodos de 6h *versus* 24h (teste t pareado, $p = 0,0026$), 6h *versus* 96h (teste t pareado, $p = 0,0026$), e aumentou no período de 24h *versus* 96h (teste t pareado, $p = 0,0010$). No grupo curcumina (droga+vírus) (figura 14C), houve redução

no crescimento do vírus apenas no período de 6h *versus* 96h (teste t pareado, $p = 0,0025$). No grupo lopinavir (droga+vírus) (figura 14D), houve aumento no crescimento do vírus entre os períodos de 6h *versus* 24h (teste t pareado, $p = 0,0038$) e redução nos períodos de 6h *versus* 96h (teste t pareado, $p < 0,0001$), 24h *versus* 96h (teste t pareado, $p < 0,0001$).

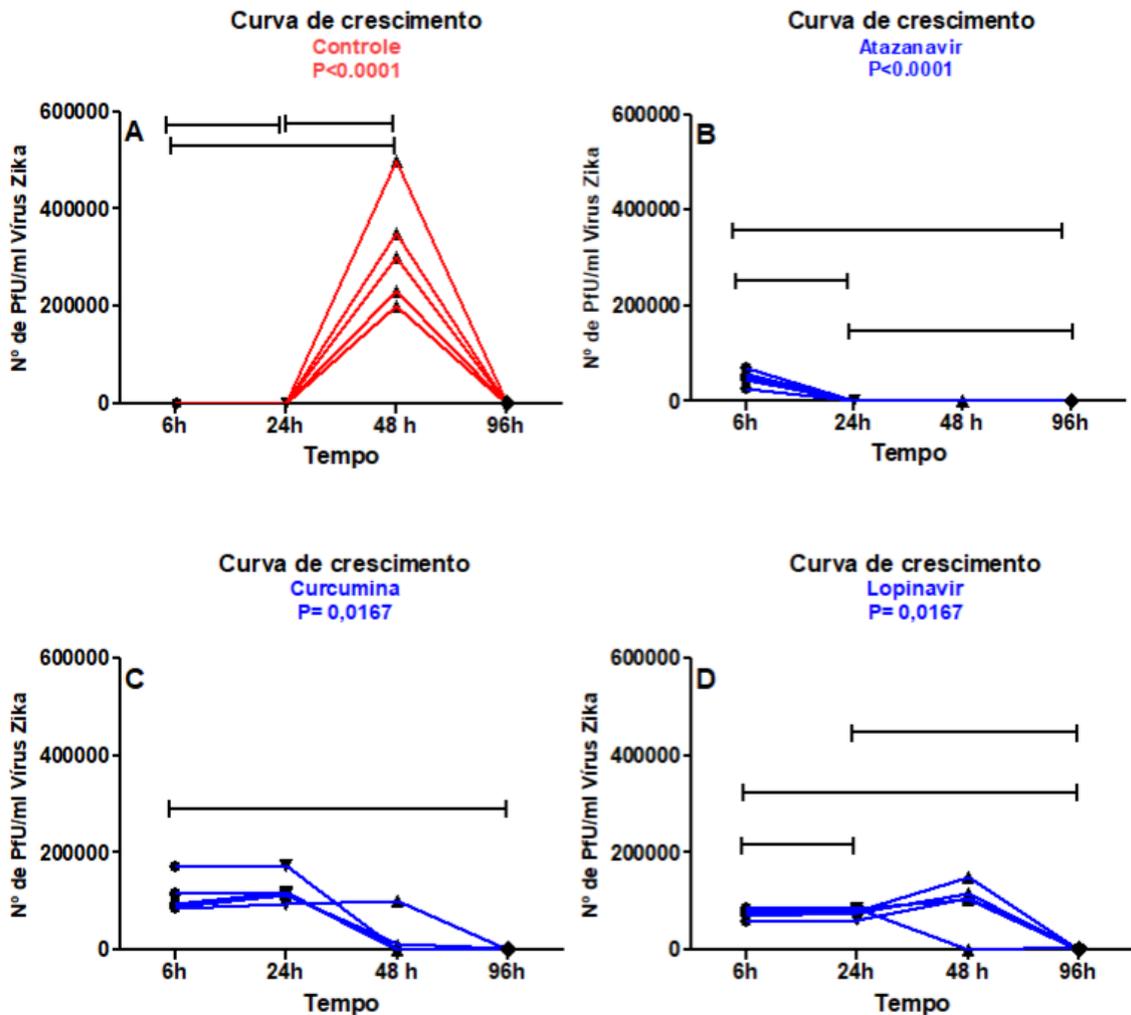


Figura 14- Influência do atazanavir, curcumina e lopinavir na curva de crescimento do vírus Zika. $n = 5$ por grupo. A- Controle, $p < 0,00016$; B- Atazanavir, $p < 0,00016$; C- Curcumina, $p = 0,0167$; D- Lopinavir, $p = 0,0167$. Teste: Friedman, seguido pelo método de Dunn.

4.2 Infecção dos neuroblastomas pelo vírus Zika, avaliado por microscopia eletrônica de transmissão

As imagens obtidas por meio do microscópio Jeol JEM-1011 e realizado conforme descrito no item 4.5 teve como objetivo, mostrar a presença do vírus Zika no interior

celular, ou seja, mostrar que o vírus infecta os neuroblastomas. As imagens representativas mostram intensa infecção no citoplasma celular (figuras 15 e 16).

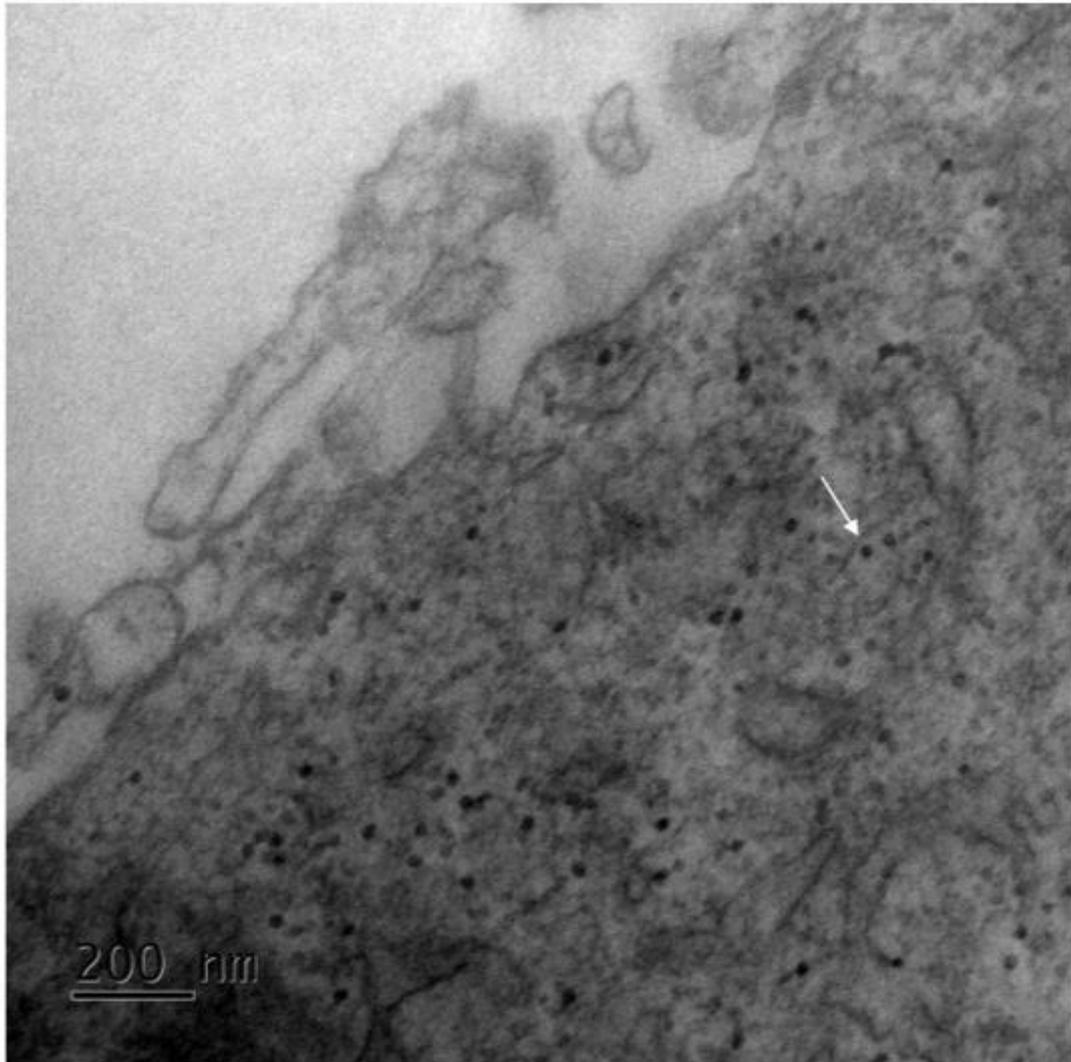


Figura 15- Avaliação da presença da infecção pelo vírus Zika em neuroblastoma. Observa-se presença do vírus no citoplasma da célula. Seta branca: Vírus Zika.

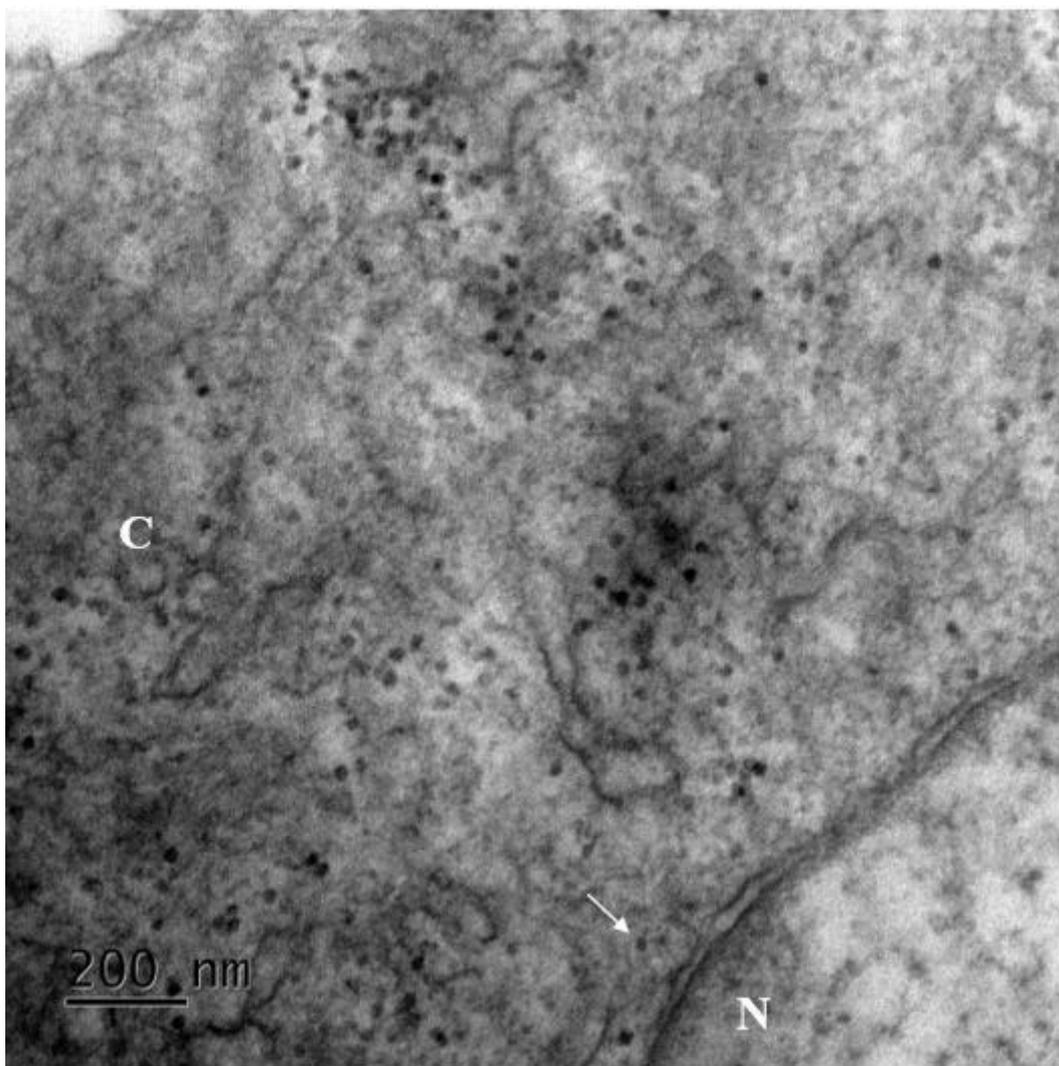


Figura 16- Presença da infecção pelo vírus Zika em neuroblastoma. Observa-se presença do vírus no citoplasma da célula. Seta branca: Vírus Zika, N: Núcleo, C: Citoplasma.

4.3 Receptores para o TNF em Neuroblastoma SK-N-BE (2) e Monócitos do sangue periférico de gestante.

Foram avaliadas a expressão dos receptores 1 e 2 para o TNF e o receptor para linfotóxina em neuroblastoma SK-N-BE (2) e em monócitos do sangue periférico de mulheres gestantes ou não incubados ou não *in vitro* com vírus Zika e tratados ou não com atazanavir, curcumina e lopinavir.

Avaliou-se nas figuras 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27 se as 3 drogas estudadas influenciam a expressão de receptores de superfície para o TNF/LTX nos neuroblastomas e nas células mononucleares do sangue periférico de gestantes e não gestantes. Nos neuroblastomas não observamos diferença estatística entre os grupos de

estudo para nenhuma das drogas testadas. A figura 17 A, B e C mostra a expressão para o r1TNF, a figura 20 A, B e C, para o r2TNF e a Figura 23 A, B e C, para o rLTX.

As diferenças na expressão dos receptores nos neuroblastomas foram claramente evidenciadas quando comparamos a expressão dos três receptores no mesmo grupo (Figuras 26). No grupo controle observamos que o receptor que apresenta maior expressão é o rLTX, seguido pelo r2TNF e o de menor expressão é o r1TNF (Figura 26A). Esse padrão de resposta é mantido para os grupos tratados com a curcumina e o lopinavir (Figuras 26 E, G). Quando analisamos o grupo incubado apenas com o vírus Zika, observamos que tanto a expressão do r2TNF, quanto a expressão do rLTX estão mais elevados do que a do r1TNF (Figura 26B) e esse padrão de resposta permanece quando os neuroblastomas são incubados com o vírus e tratados com as três drogas (Figuras D, F, H). Não houve diferença nas repostas dos grupos que foram incubados isoladamente com a curcumina e o lopinavir (Figura 26 E, G). Porém, no grupo incubado com o atazanavir, observamos maior expressão do rLTX do que os outros dois receptores (Figura 26 C). Quando analisamos os grupos concomitantemente incubados com o vírus Zika e as drogas, observamos que todos os grupos mostraram maior expressão dos receptores r2TNF e do rLTX, não havendo diferença estatisticamente significante entre estes dois, sendo que o r1TNF foi o de menor expressão em todos os grupos (Figura 26 B, D, F e H).

Pela figura 18 A, onde foi analisado as mulheres não gestantes e na figura 18 B, onde foi analisado as mulheres gestantes observamos que não houve diferença estatisticamente significante no efeito das drogas sobre a expressão do r1TNF quando foi comparado o tratamento com o controle e com o grupo infectado com o vírus Zika, mas que não foi tratado. Resultado semelhante foi mostrado nas figuras 21 A e B, onde foi avaliado o r2TNF e na 24 A e B, onde foi avaliado o rLTX.

Entretanto, as diferenças na expressão dos receptores nas células foram evidentes quando comparamos os grupos não gestantes e gestantes (figuras 19, 22 e 25). Na presença ou não do vírus, com ou sem tratamento, ficou evidenciado que os monócitos das não gestantes têm maior expressão do r1TNF (figura 19), e como mostrado na figura 25, as células das gestantes tiveram maior expressão de rLTX. Não houve diferença significativa entre os grupos pela análise do r2TNF (figura 25).

Pela comparação da expressão dos três receptores nos monócitos do sangue periférico, por grupo de estudo (figura 19 A-H), observamos que houve diferenças significativas entre eles. Observamos que no grupo controle, pela análise da expressão

dos três receptores nas mulheres não gestantes houve maior expressão do r1TNF do que do rLTX, enquanto não houve diferença na expressão dos três receptores entre as mulheres gestantes. Comparando mulheres gestantes com não gestantes, observamos maior expressão do r1TNF naquelas não gestantes do que nas gestantes (figura 19A).

No grupo Zika, no qual os monócitos foram encubados com o vírus, observamos que nas mulheres não gestantes, o r2TNF e rLTX tiveram menor expressão que o r1TNF, enquanto nas gestantes, não houve diferença na expressão dos 3 receptores. Pela comparação entre mulheres gestantes ou não, observamos que houve maior expressão do r1TNF nas mulheres não gestantes e maior expressão do rLTX naquelas gestantes (figura 19B).

Na avaliação dos monócitos das mulheres não gestantes tratadas isoladamente com o atazanavir, curcumina e lopinavir, observamos que diferente do controle basal o r2TNF e rLTX tiveram menor expressão que o r1TNF (Figuras 19 C, E, G). Para os monócitos das gestantes tratadas com o atazanavir, curcumina e lopinavir não houve diferença estatística na expressão dos três receptores (Figuras 19 C, E, G). Enquanto, na comparação das mulheres não gestantes com as gestantes, apenas para aquelas tratadas com o atazanavir a expressão do rLTX foi mais elevada nas gestantes (Figura 19C). Quando incubamos concomitante as células com o vírus, para os três tratamentos, com o atazanavir, curcumina e lopinavir, apenas nas mulheres não gestantes a maior expressão do r1TNF do que do r2TNF foi estatisticamente significativa (Figura 19 D, F, H).

Em conclusão, os neuroblastomas expressam constitutivamente o receptor rLTX para o TNF, que é um dos receptores que ativam a via não canônica do NF- κ B. No estado basal dos neuroblastomas, o rLTX teve maior expressão do que o r2TNF que teve maior expressão do que o r1TNF ($rLTX > r2TNF > r1TNF$). Quando os neuroblastomas foram incubados com o vírus Zika, a expressão do rLTX foi igual à do r2TNF e ambos forma tiveram maior expressão do que o r1TNF ($rLTX = r2TNF > r1TNF$) (Figura 26). Nenhuma das drogas estudadas (atazanavir, curcumina e lopinavir) modificou a expressão dos receptores nos neuroblastomas, indicando que a maior expressão do r2TNF quando da incubação do vírus + drogas deveu-se à ação do vírus Zika, sem ter sido modificada pelas drogas testadas (Figura 26).

No estado basal, os monócitos do sangue periférico das mulheres não gestantes apresentaram expressão oposta ao que foi observado para a expressão dos receptores nos neuroblastomas, sendo que o $r1TNF > r2TNF > rLTX$. (Figura 19). Entretanto, na

situação basal, nos monócitos das gestantes a expressão dos três receptores foram semelhantes. Além disso, mostrou que o $r1TNF > r1TNFG$ (Figura 19). Quando os monócitos das mulheres não gestantes foram incubados com o vírus Zika, a expressão do $r1TNF > r2TNF = rLTX$, portanto, o oposto do que foi observado para a resposta dos neuroblastomas à incubação com o vírus Zika. E a expressão dos três receptores não foram estatisticamente diferentes nos monócitos das mulheres gestantes, mas ficou mais bem evidenciado que o $r1TNF > r1TNFG$ e que o $rLTX < rLTXG$ das mulheres não gestantes.

Quando os monócitos foram tratados com o atazanavir, curcumina e lopinavir isoladamente, a expressão dos receptores foi: $r1TNF > r2TNF = rLTX$, que foi o mesmo efeito observado quando da incubação com o vírus Zika. E, quando incubadas com o vírus e tratadas com as drogas, as respostas dos monócitos das não gestantes mantiveram-se semelhantes ao do grupo não tratado ($r1TNF > r2TNF = rLTX$) e para as das gestantes, a expressão dos três receptores foi semelhante, embora com certa variação de distribuição (Figura 19).

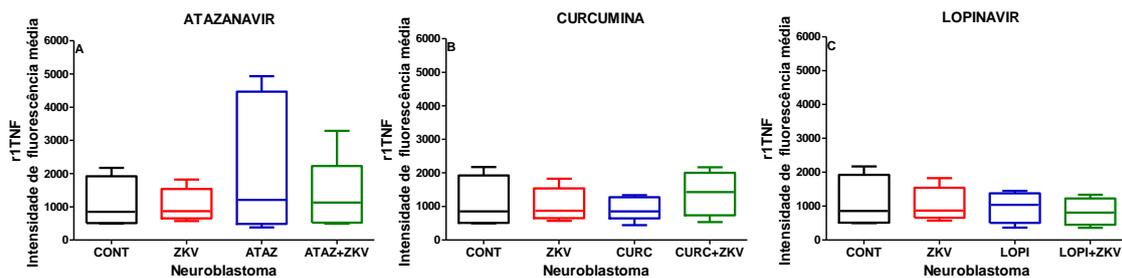


Figura 17- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor 1 para o Fator de Necrose Tumoral (TNF) no Neuroblastoma SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. A- Atazanavir, $p= 0,8459$; B- Curcumina, $p= 0,7050$; C- Lopinavir, $p= 0,9028$. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey; ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

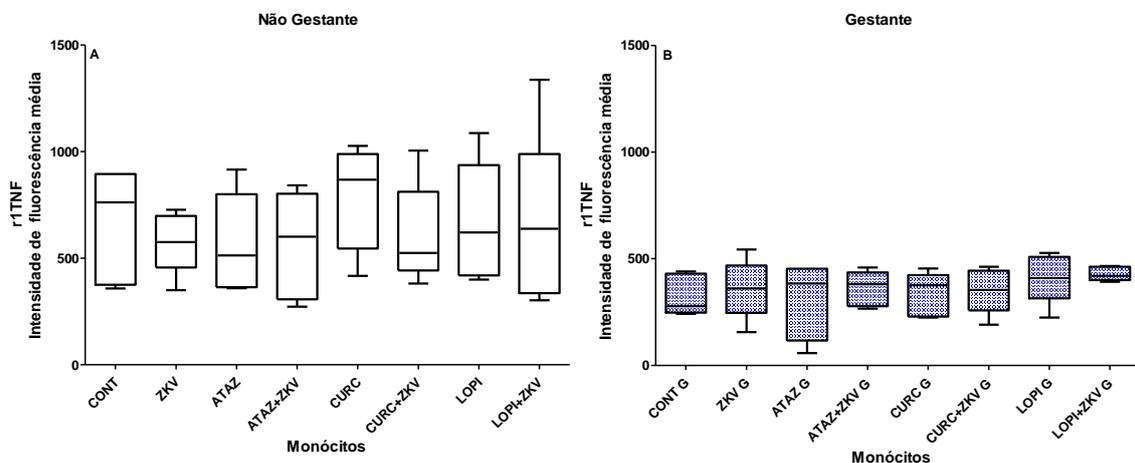


Figura 18- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor 1 para o Fator de Necrose Tumoral (TNF) monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. A- r1TNF NG, p= 0,9022¹; B- r1TNF G, p= 0,6902¹. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

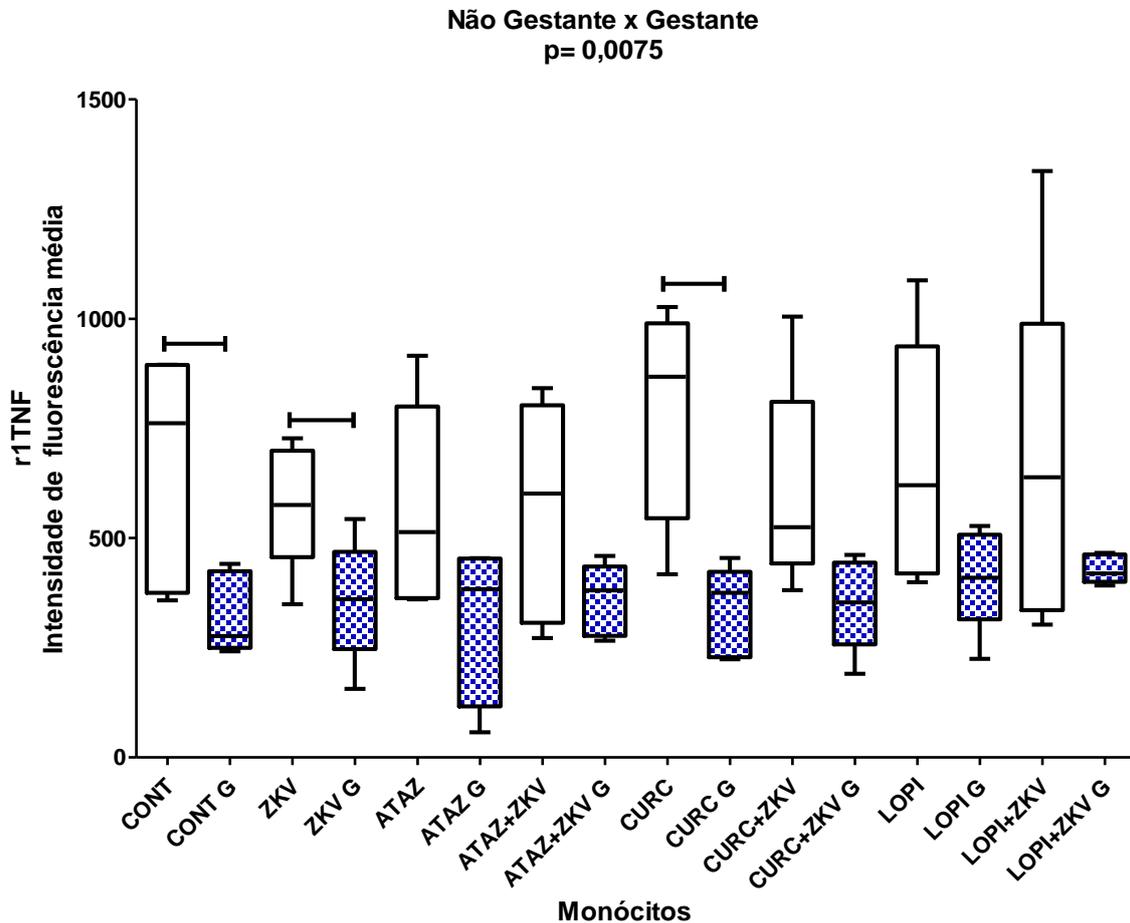


Figura 19- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor 1 para o Fator de Necrose Tumoral (TNF) nas células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) *versus* gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. p= 0,0075². As diferenças estatísticas estão representadas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

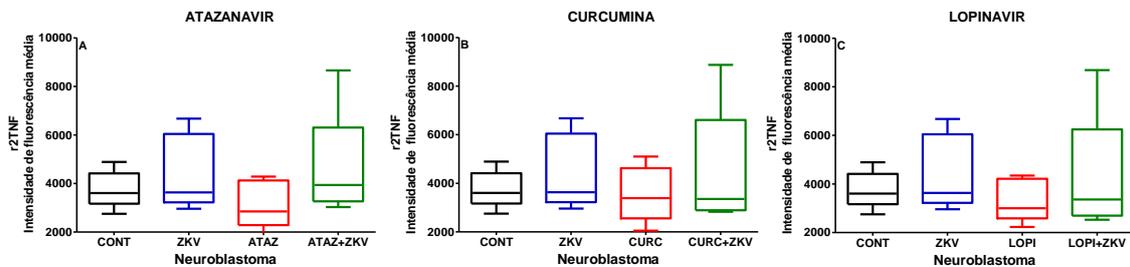


Figura 20- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor 2 para o Fator de Necrose Tumoral (r2TNF) no Neuroblastoma SK-N-BE (2) incubado ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n=5 por grupo. A- Atazanavir, p= 0,5275; B- Curcumina, p= 0,7483; C- Lopinavir, p= 0,7109. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey; ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

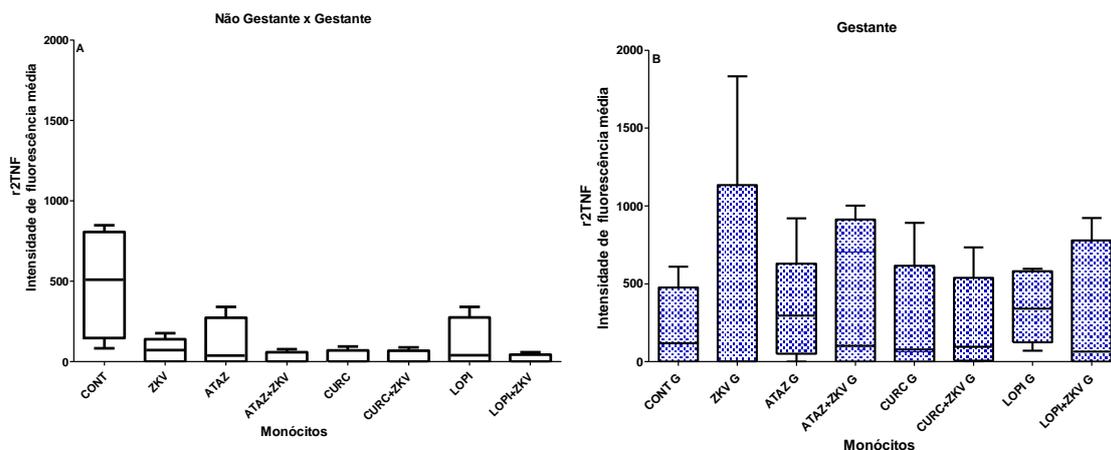


Figura 21- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor 2 para o Fator de Necrose Tumoral (TNF) nas células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. A- r2TNF NG, p= 0,0958²; B- r2TNF G, p= 0,9902¹. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

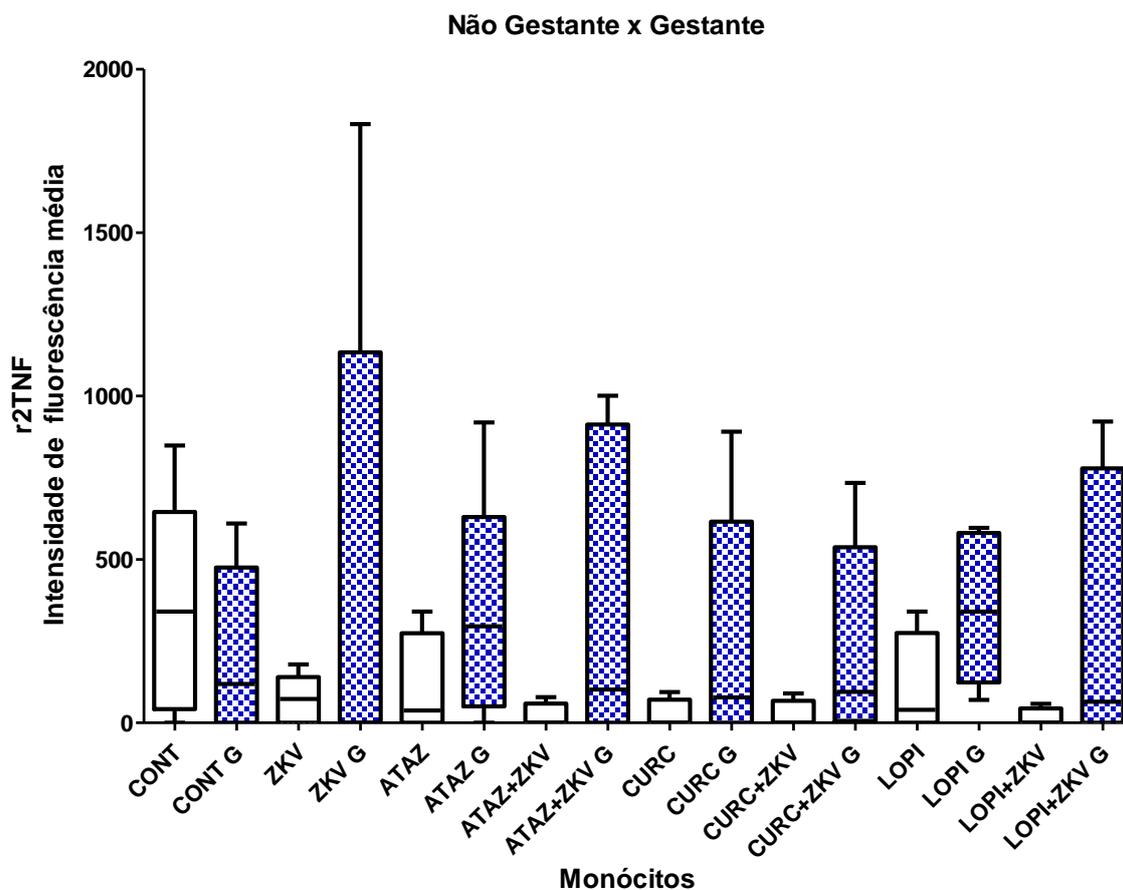


Figura 22- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor 1 para o Fator de Necrose Tumoral (TNF) nas células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) versus gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n=5 por grupo. p=0,2874². Os

dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

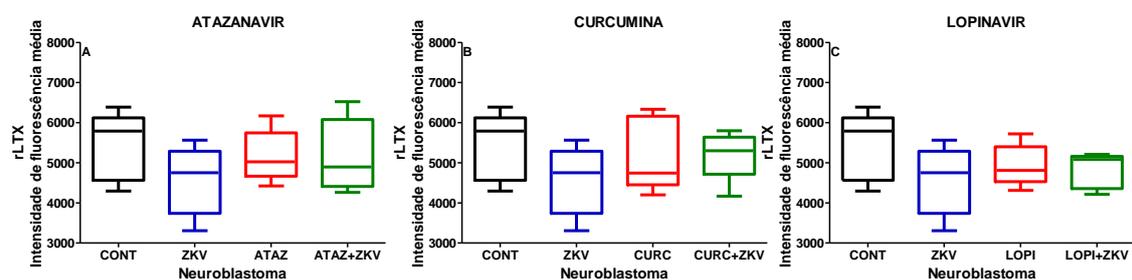


Figura 23- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor para Linfotoxina (rLTX) no Neuroblastoma SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n=5 por grupo. A- Atazanavir, p= 0,4160; B- Curcumina, p= 0,4022; C- Lopinavir, p= 0,2852. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey; ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

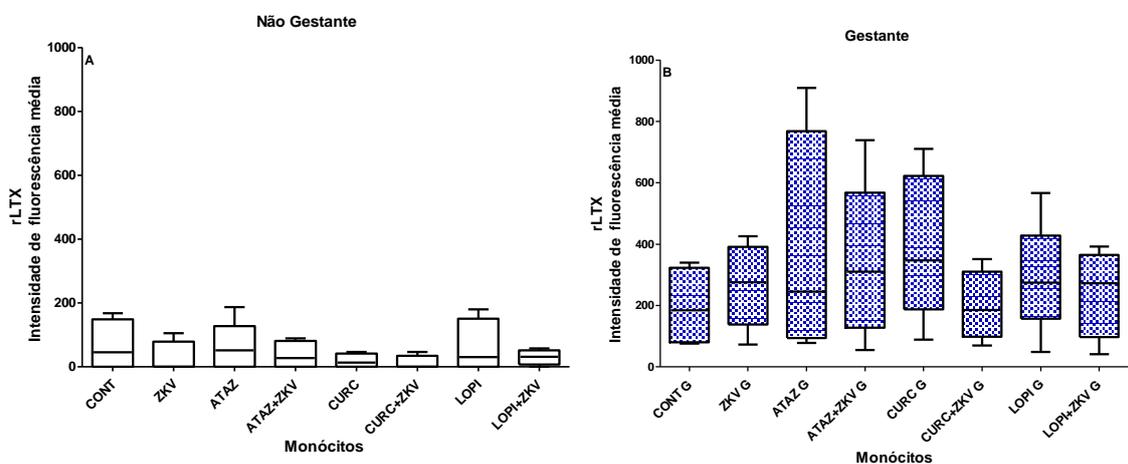


Figura 24- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor para Linfotoxina (rLTX) nas células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. A- rLTX NG, p= 0,8704²; B- rLTX G, p= 0,8037¹. Não houve diferença estatística entre os grupos. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

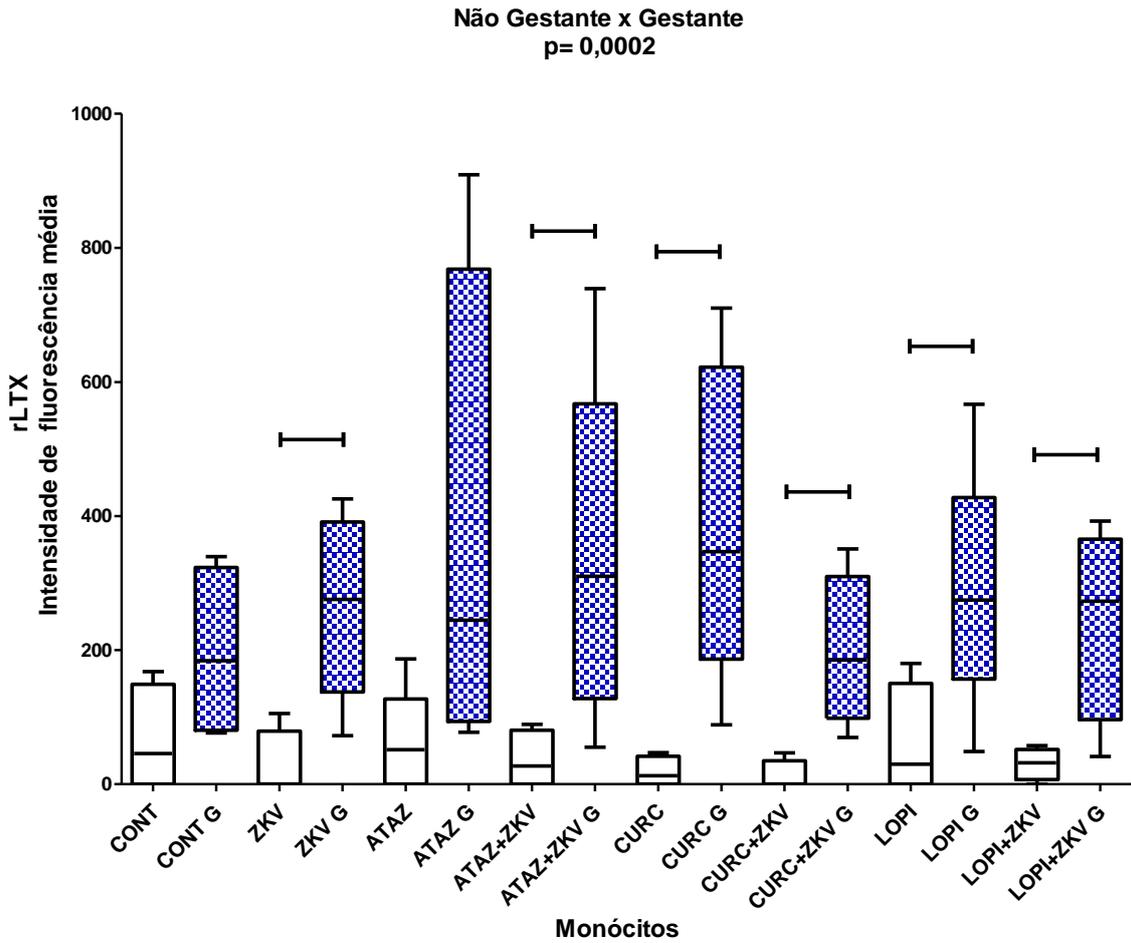


Figura 25- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do receptor para linfotóxina (rLTX) nas células mononucleares de não gestantes (NG) *versus* gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n=5 por grupo. p=0,0002². As diferenças estatísticas estão representadas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

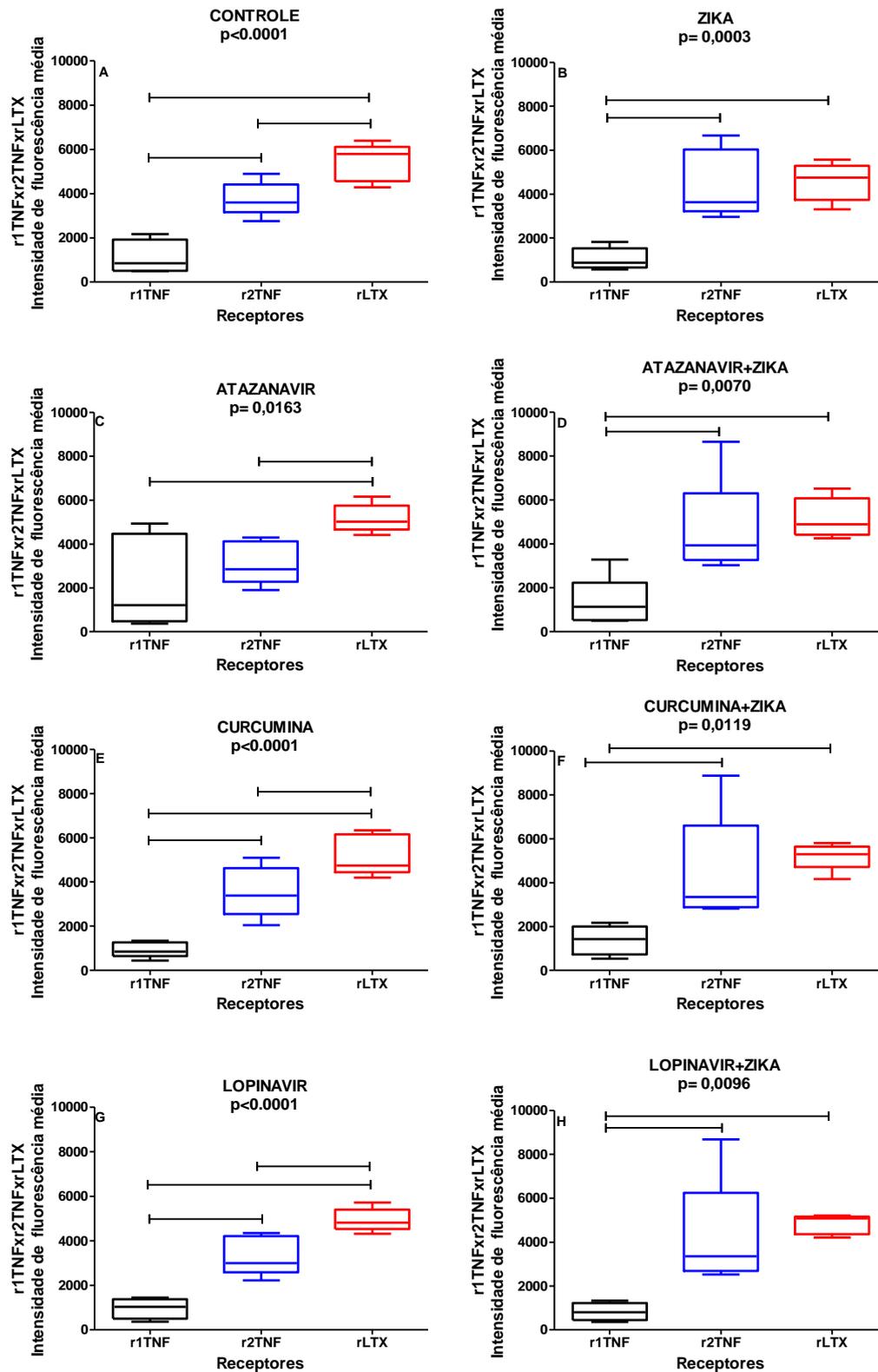


Figura 26- Comparação do efeito da infecção com o vírus zika e do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão dos receptores para o TNF (r1TNF, r2TNF e rLTX) em neuroblastomas, em cada um dos 8 grupos estudados avaliado por citometria de fluxo. n=5 por grupo. A- Controle, p= 0.0001¹; B- Zika, p= 0,0003¹; C- Atazanavir, p= 0,0163¹; D- Atazanavir+Zika, p= 0,0070²; E- Curcumina, p= 0.0001¹; F- Curcumina+Zika, p= 0,0119¹; G- Lopinavir, p= 0.0001¹; H- Lopinavir+Zika, p= 0,0096². As diferenças estatisticamente significantes entre os receptores estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em

medianas, quartis e extremos. Testes: Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey; ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

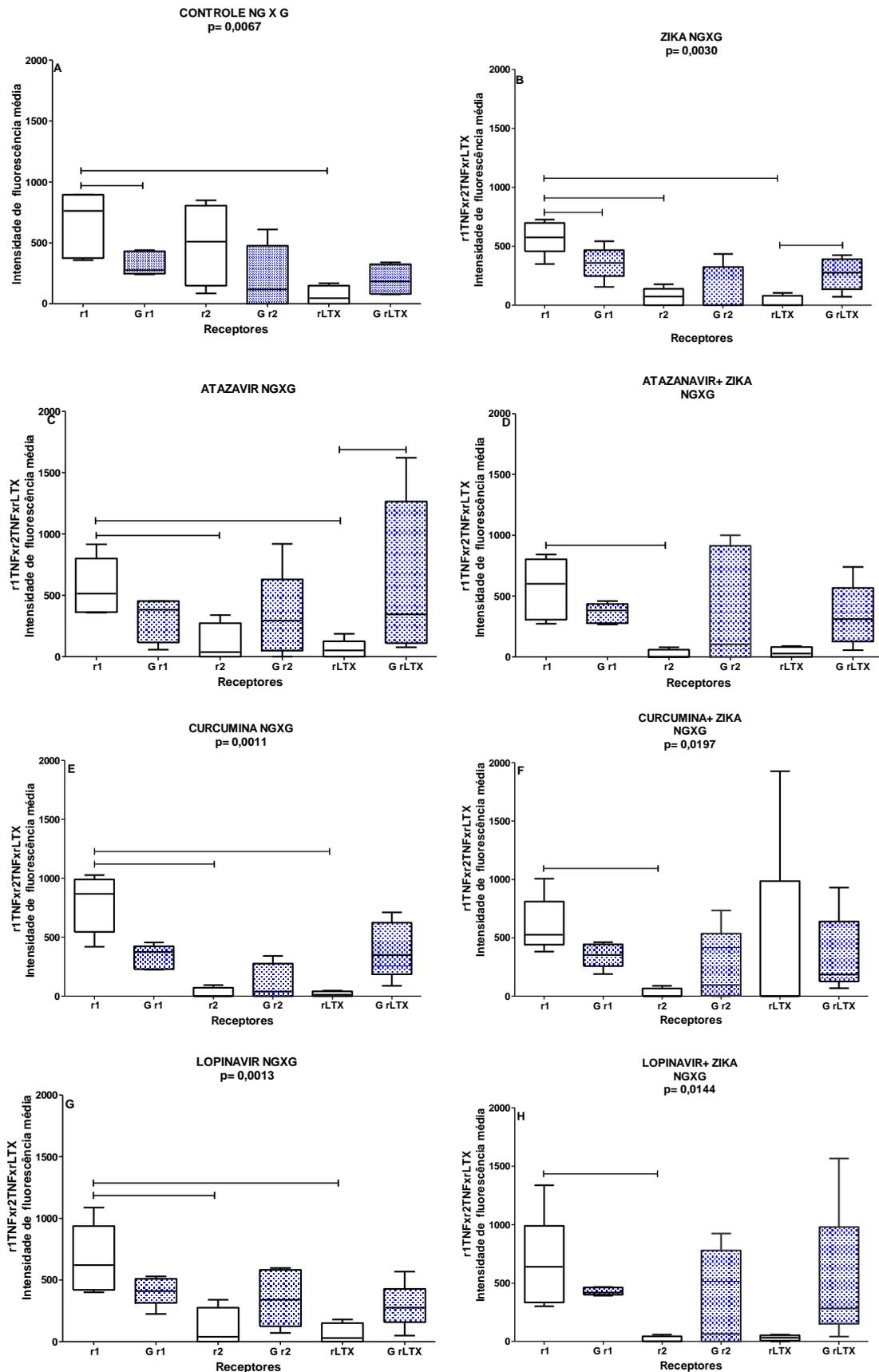


Figura 27- Comparação do efeito da infecção com o vírus Zika e do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão dos receptores para o TNF (r1TNF, r2TNF e rLTX) em cada

grupo estudado em células mononucleares do sangue periférico, avaliado por citometria de fluxo. n= 5 por grupo. A- Controle, p= 0,0067¹; B- Zika, p= 0,0030²; C- Atazanavir, p= 0,0882¹; D- Atazanavir+Zika, p= 0,0174²; E- Curcumina, p= 0,0011²; F- Curcumina+Zika, p= 0,0197²; G- Lopinavir, p= 0,0144²; H- Lopinavir+Zika, p= 0,8964². As diferenças estatisticamente significantes entre os receptores estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey; ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

No anexo 1 encontram-se imagens representativas dos histogramas de avaliação dos receptores r1TNF, r2TNF e rLTX em neuroblastoma.

4.4 Moléculas da via do NF- κ B em Neuroblastoma SK-N-BE (2) e Monócitos do sangue periférico de gestante.

Influência do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão das moléculas da via do NF- κ B, em neuroblastomas e monócitos incubados ou não com vírus Zika.

As moléculas coadaptadoras FADD e TRAF da via do NF κ B são as primeiras a serem ligadas após o estímulo pelos receptores para o TNF, e participam da determinação da escolha de qual via será ativada. Para verificar se existem diferenças entre os 3 tratamentos na expressão dessas moléculas, foram analisadas por citometria de fluxo a expressão do FADD e TRAF nos neuroblastomas, nos 8 grupos de estudo.

4.4.1 FADD

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula coadaptadora FADD, em neuroblastomas e monócitos incubados ou não com vírus Zika

Na figura 28, as comparações são estratificadas por tratamento, de acordo com os grupos de estudo, sendo que a figura 28A, mostra o tratamento com Atazanavir (Controle, ZKV, ATAZ e ATAZ+ZKV); Na 21B, tratamento com Curcumina (Controle, ZKV, CURC e CURC+ZKV); Na 22C, o tratamento com Lopinavir (Controle, ZKV, LOPI e LOPI+ZKV).

Quando comparados os grupos por tratamento, observamos na figura 28A, que o Atazanavir (ATAZ) aumentou expressou da molécula FADD em comparação com o Controle e com o grupo ZKV (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey p=0,0261), sendo que o grupo ATAZ+ZKV foi maior que o grupo ZKV (ANOVA, seguido pelo teste de

Tukey $p=0,0261$). Na figura 28B, o tratamento com a curcumina não modificou a expressão do FADD. Na figura 28C, o Lopinavir (LOPI) também aumentou a expressão da molécula FADD em comparação com o Controle e com ZKV, mas a expressão do FADD foi inferior no grupo LOPI+ZKV, quando comparado ao grupo tratado apenas com a droga (LOPI).

A figura 29A mostra a análise da expressão do FADD pelos monócitos das mulheres não gestantes e a figura 29B, das gestantes. Tanto para as não gestantes (figura 29A), quanto para as gestantes (29B), não houve diferença estatística entre seus grupos, não havendo alteração dessas moléculas quando incubadas com o vírus, quando tratadas com a drogas e quando incubadas com ambos (vírus + droga).

Quando avaliamos comparativamente não gestantes e gestantes, o grupo dos monócitos incubados concomitantemente com o vírus ZIKA e o atazanavir tiveram menor expressão do FADD nas mulheres gestantes do que nas não gestantes. De modo semelhante, o grupo tratado isoladamente com a curcumina também mostrou menor expressão do FADD pelas células das mulheres gestantes (Figura 30).

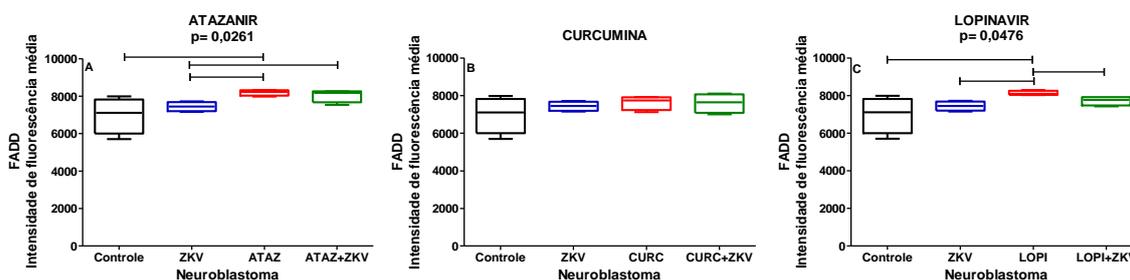


Figura 28- Comparação do efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do FADD, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas infectados ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. $n = 5$ por grupo. A- Atazanavir, $p= 0,0261$ ¹; B- Curcumina, $p= 0,4086$ ¹; C- Lopinavir, $p=0,0476$ ¹. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

No anexo 2 encontram-se imagens representativas do histograma de avaliação da molécula FADD em neuroblastoma.

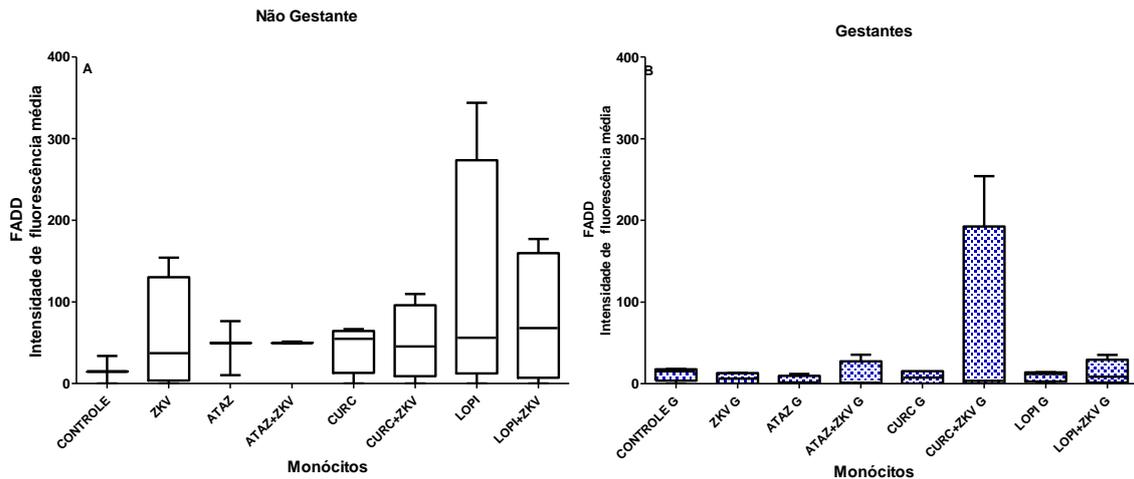


Figura 29- Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula FADD avaliada pela Intensidade de Fluorescência Média nos monócitos do sangue periférico incubados ou não com vírus zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- FADD NG, $p= 0,8981^2$; B- FADD G, $p= 0,8722^2$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

Não Gestante x Gestante

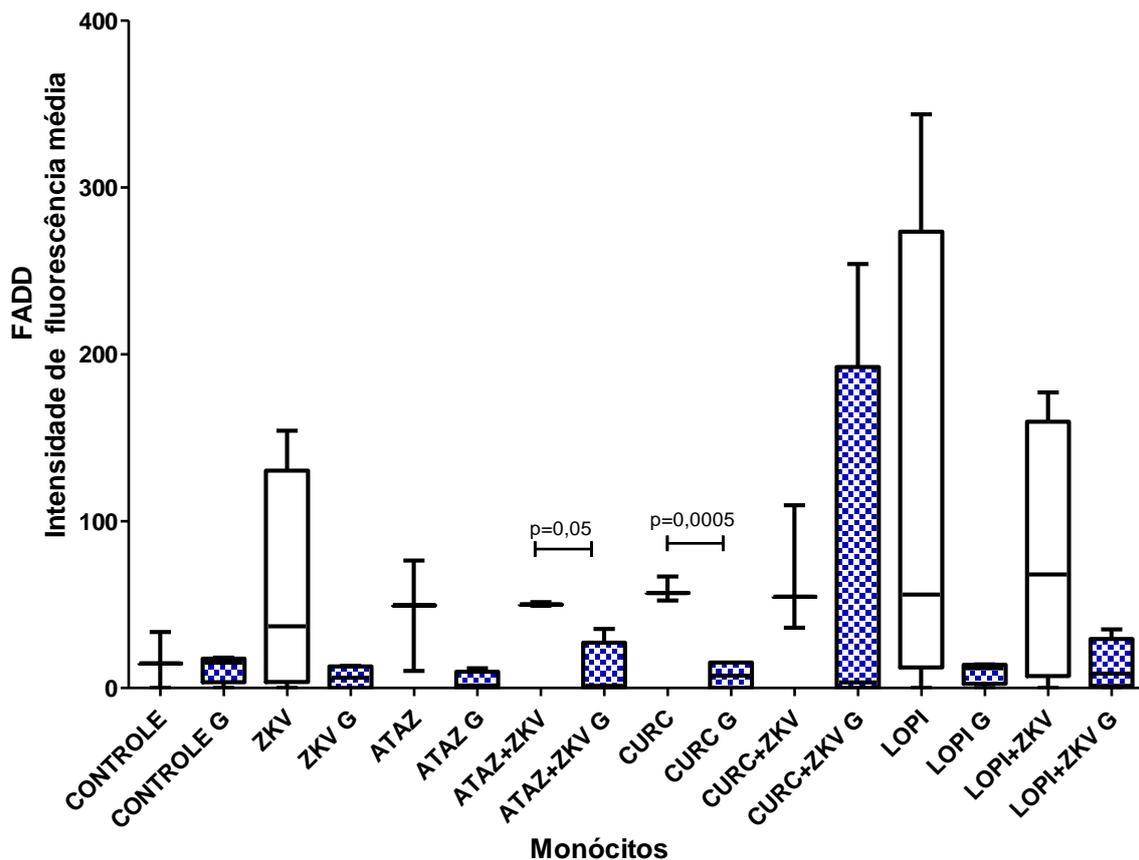


Figura 30- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula FADD nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) X gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. $p = 0,0701^2$. As diferenças estatísticas estão representadas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.4.2 TRAF

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula coadaptadora TRAF, em neuroblastomas e monócitos incubados ou não com vírus Zika.

Na figura 31 estão sendo comparadas as respostas dos três modelos de tratamento realizados, segundo os grupos de estudo.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na expressão do TRAF, nem em relação ao grupo controle e nem em relação ao grupo incubado com vírus ZIKA. Pela análise dos tratamentos com as drogas separadamente, também não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 31 A, B e C).

Quando avaliamos a expressão da molécula coadaptadora TRAF nas células de não gestantes verificamos que a infecção pelo vírus ZIKA aumentou a expressão do TRAF em relação ao grupo controle basal (Figura 32A). Resultado semelhante foi observado no grupo das células das não gestantes tratadas pelo lopinavir, no qual verificamos maior expressão do TRAF no grupo incubado concomitantemente com o lopinavir e o vírus ZIKA do que no grupo tratado apenas com o lopinavir (figura 32A). Pela análise da expressão do TRAF nas células das gestantes, observamos que apenas no grupo tratado isoladamente com o atazanavir houve diminuição da expressão do TRAF (figura 32B).

Pela análise comparativa da expressão do TRAF pelas células de não gestantes e gestantes, observamos que apenas no grupo controle basal houve maior expressão estatisticamente significativa do TRAF pelos monócitos das gestantes (Figura 33).

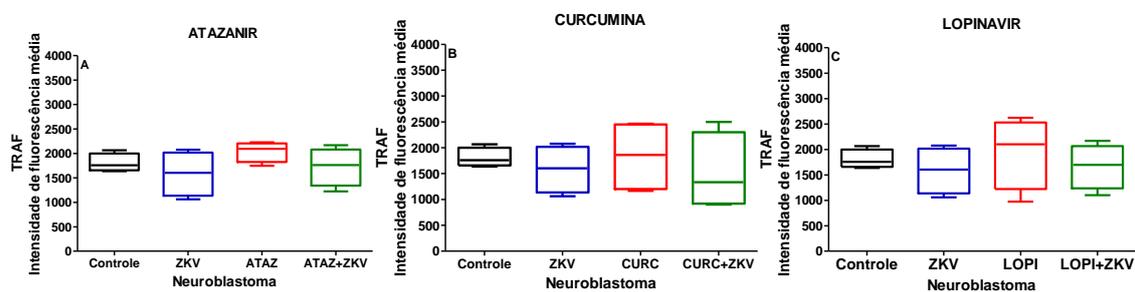


Figura 31- Comparação do efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula TRAF, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas infectados ou não com vírus zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- Atazanavir, p= 0,3125¹; B- Curcumina, p= 0,8151¹; C- Lopinavir, p= 0,7290¹. Na análise separada dos tratamentos, não houve diferença entre os grupos. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

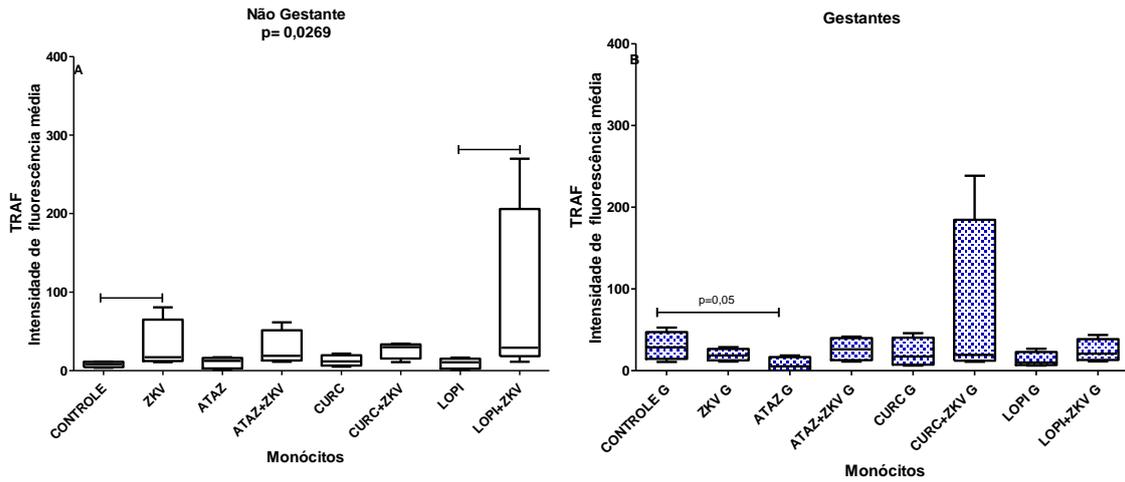


Figura 32- Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula FADD, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos monócitos de mulheres não gestantes (NG) ou gestantes (G), avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- TRAF NG, p= 0,0269²; B- TRAF G, p= 0,2868². Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

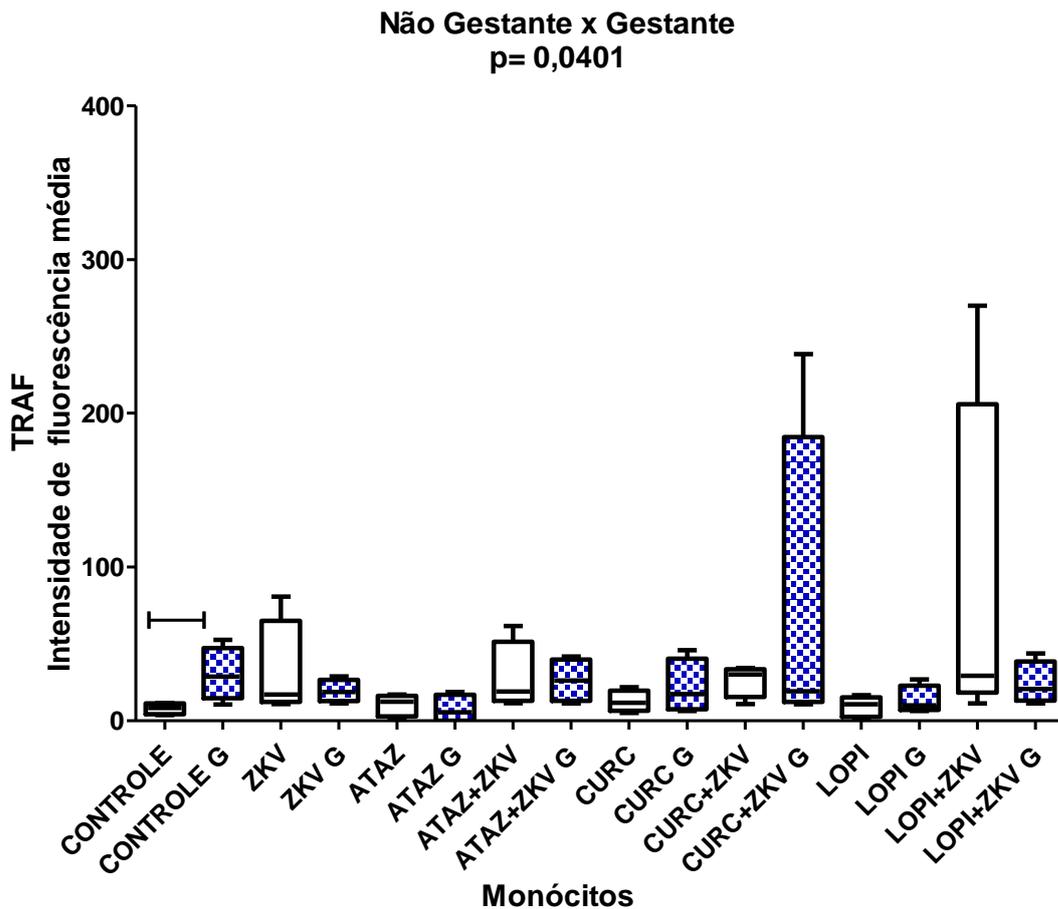


Figura 33- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula TRAF nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) X gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n=5 por grupo. p=0,0401². As diferenças estatísticas estão representadas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.4.3 Comparação entre as moléculas FADD e TRAF

Observamos que nem a infecção pelo vírus ZIKA e nem os tratamentos realizados modificaram a expressão do TRAF nos neuroblastomas (figura 34B). Entretanto, a expressão do FADD foi muito mais elevada que a expressão do TRAF, como mostram as figuras 34A e 35. Pela análise comparativa entre a expressão do FADD e do TRAF nos 8 grupos de estudo, verificamos que houve maior expressão do FADD do que do TRAF em todos os grupos de estudo (ANOVA, seguido pelo método de Tukey e teste t $p < 0.0001$) (figura 31).

A análise comparada das moléculas FADD e TRAF entre os monócitos das não gestantes e gestantes, separado por grupo de estudo (figura 36), mostrou que mesmo com a incubação com o vírus Zika ou os tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir não promoveu uma diferença estatística entre as suas expressões.

Quando avaliadas de forma individualizada, nas não gestantes e gestantes, foi possível observar que a molécula FADD foi mais expressa que TRAF nos grupos curcumina e o oposto ocorreu no grupo ZIKA das gestantes, onde TRAF foi mais expressa (Figura 37).

Em conclusão, a incubação com o vírus Zika não modificou a expressão do FADD nem do TRAF nos neuroblastomas (Figuras 28 e 31). Entretanto, nos neuroblastomas o FADD foi muito mais expresso do que o TRAF, tanto basal como em todos os tratamentos estudados (Figuras 34 e 35). Não houve diferença na expressão do FADD na situação basal e nem após a incubação com o vírus Zika e os três tratamentos utilizados nos monócitos das não gestantes ou gestantes (Figuras 36). Entretanto, diferentemente dos neuroblastomas, observamos maior expressão basal do TRAF do que do FADD nos monócitos das gestantes do que nas não gestantes (Figura 37). E nas mulheres não gestantes a incubação com o vírus Zika aumentou a expressão do TRAF, o que não observamos nos monócitos das gestantes (Figura 39). Entretanto, nos monócitos das gestantes incubadas com o vírus Zika houve maior expressão do TRAF do que do FADD (Figura 36B).

Nos neuroblastomas, o atazanavir e o lopinavir isoladamente aumentaram a expressão do FADD, mas no grupo Lopi+ZKV houve reversão desse aumento (Lopi > Lopi+ZKV (Figura 28). Nos monócitos das não gestantes, ocorreu o inverso, o grupo Lopi+ZKV > Lopi. E nos monócitos das gestantes o atz < controle (Figura 29).

Outro aspecto que chama a atenção é que a intensidade de fluorescência média tanto do FADD quanto do TRAF foi muito mais intensa nos neuroblastomas do que nos monócitos.

Ao comparar os resultados obtidos entre não gestantes e gestantes, o grupo atazanavir incubado com vírus Zika e o grupo curcumina dos monócitos das não gestantes mostraram maior expressão de FADD do que as gestantes. Ao analisar a expressão da molécula TRAF nos monócitos das mulheres não gestantes, o grupo incubado com o vírus Zika apresentou maior expressão do TRAF do que o grupo controle não incubado com o vírus e grupo lopinavir+zika expressou mais TRAF que o grupo lopinavir (figura 32A). Para as gestantes, o controle apresentou maior expressão do TRAF do que o grupo tratado apenas com atazanavir (Figura 32B). Na comparação da produção de TRAF, apenas o grupo controle mostrou diferença estatística, sendo a gestante a maior produtora dessa molécula (Figura 33). Na comparação entre FADD e TRAF entre gestante e não gestante apenas no grupo atz+ZKV observamos maior expressão estatisticamente significativa do TRAF do que do FADD (figura 36B).

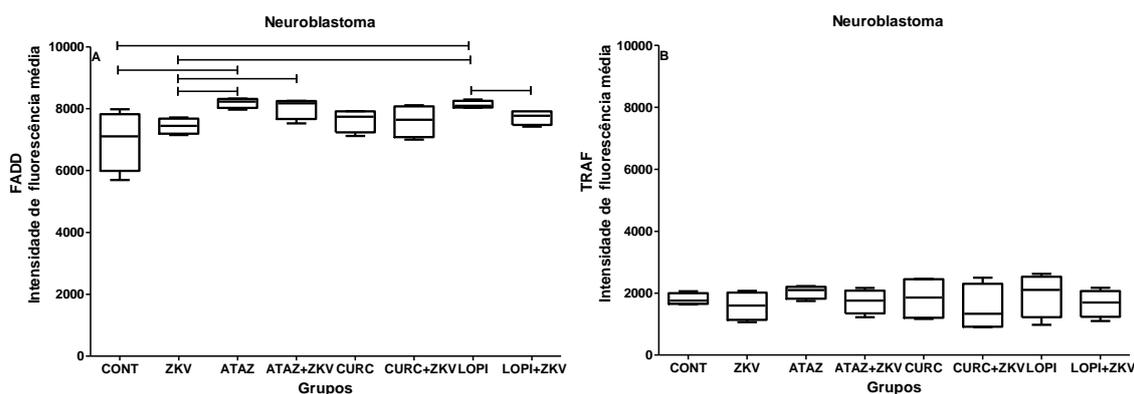


Figura 34- Comparação da Intensidade de Fluorescência Média entre os grupos de estudo, na molécula FADD (A) e na molécula TRAF (B), avaliados por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- FADD, $p= 0,0151^1$; B- TRAF, $p= 0,8478^1$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

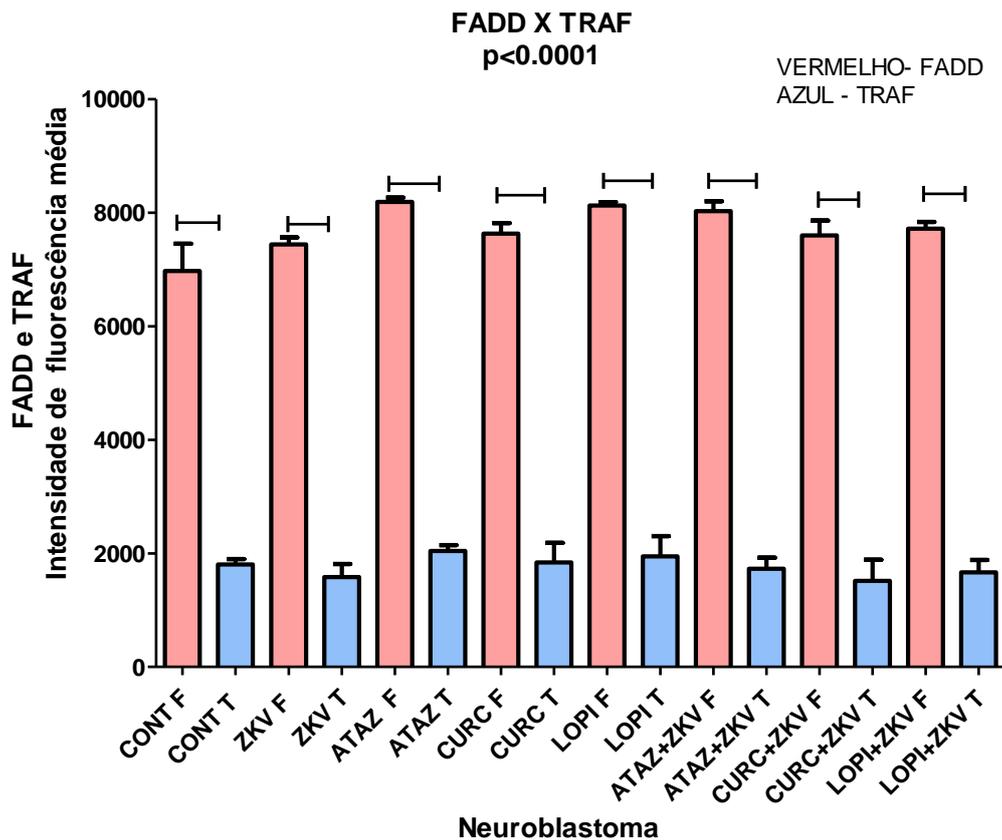


Figura 35- Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão das moléculas FADD e TRAF, expressas pela Intensidade de Fluorescência Média, nos neoblastomas infectados ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. $p = p < 0.0001$ ¹ e nas comparações individuais (Cont F X Cont T, ZKV F X ZKV T, ATAZ F X ATAZ T, CURC F X CURC T, LOPI F X LOPI T, ATAZ+ZKV F X ATAZ+ZKV T, CURC+ZKV F X CURC+ZKV T, LOPI+ZKV F X LOPI+ZKV T) o valor de $p < 0.0001$ ³. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ³Teste t.

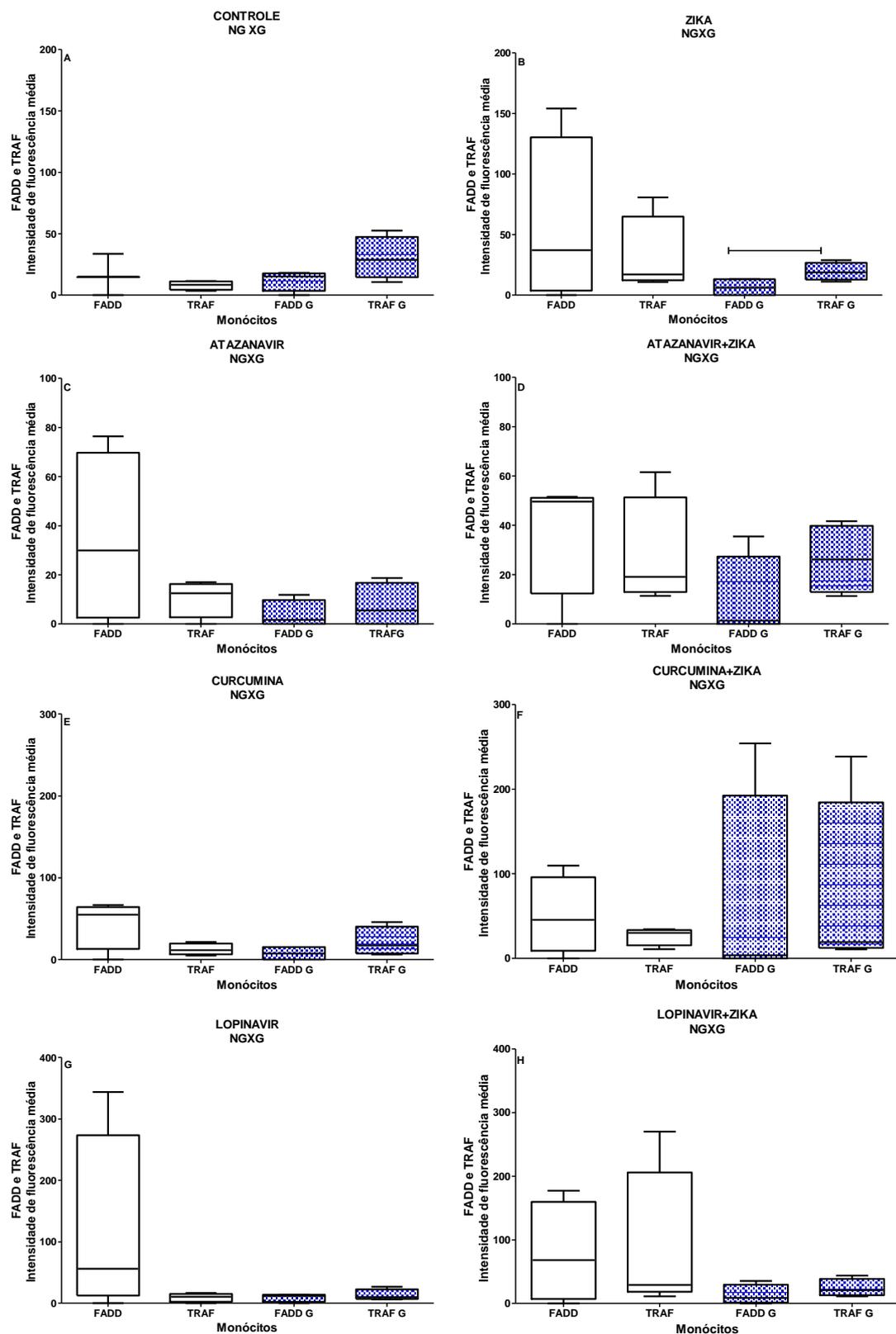


Figura 36- Comparação da Intensidade de Fluorescência Média das moléculas FADD e TRAF entre as não gestantes e gestantes em cada grupo de estudo, avaliados por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- Controle, $p= 0,1970^2$; B- Zika, $p= 0,2325^2$; C- Atazanavir, $p= 0,1522^1$; D- Atazanavir+Zika, $p= 0,2845^2$; E- Curcumina, $p= 0,0666^1$; F- Curcumina+Zika, $p= 0,6350^2$; G- Lopinavir, $p= 0,4740^2$; H- Lopinavir+Zika, $p= 0,3091^1$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

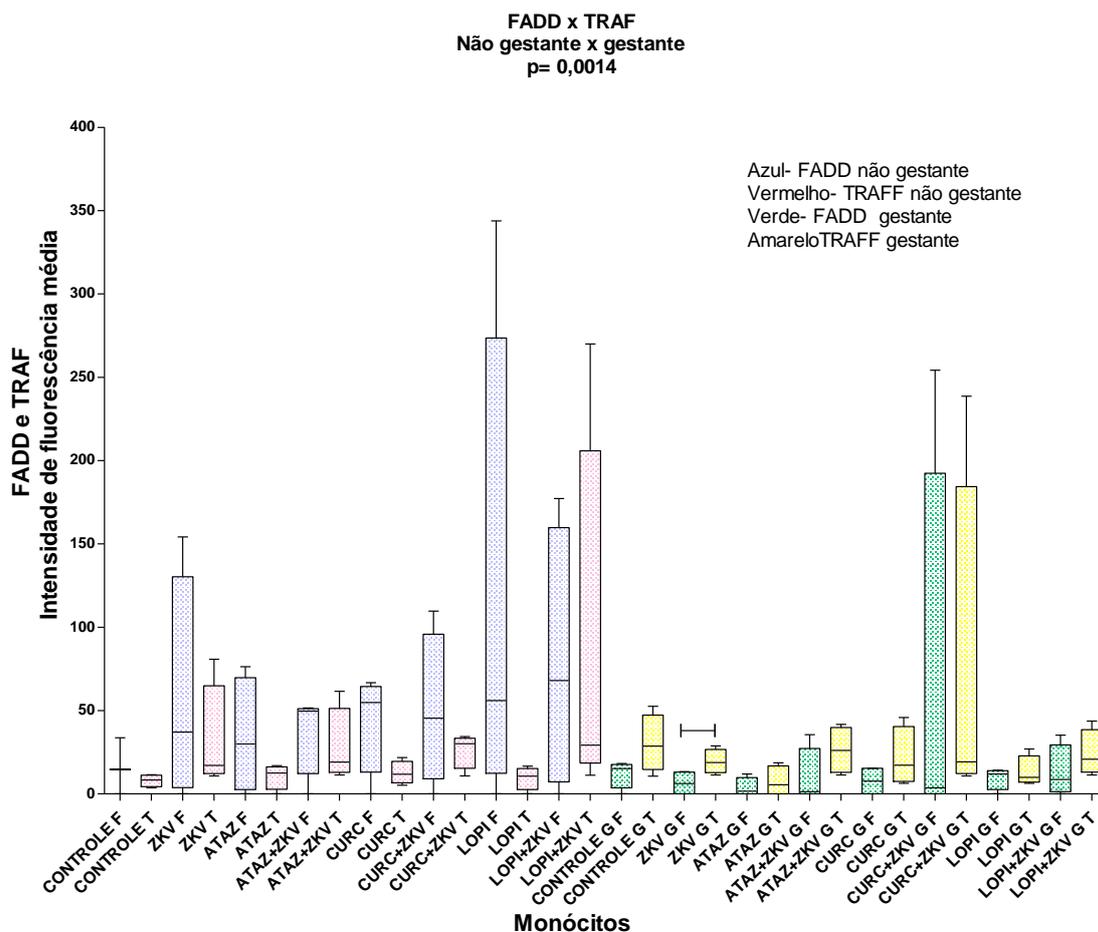


Figura 37- Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir, na Intensidade de Fluorescência Média das moléculas FADD e TRAF nos monócitos incubados ou não com vírus zika das não gestantes e das gestantes, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. p = 0,0014². As diferenças estatísticas estão representadas pelas barras. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.4.4 NIK

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula NIK, em neuroblastomas e monócitos de gestantes incubados ou não com vírus Zika

Nem a infecção pelo vírus ZIKA, nem o tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir modificaram a expressão do NIK (Figura 38 A, B e C).

O tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir e a incubação com o vírus ZIKA não modificaram a expressão da molécula NIK nos monócitos, exceto para o grupo incubado concomitantemente com a curcumina mais o vírus Zika, que mostrou menor expressão do NIK do que o grupo incubado apenas com a curcumina das não gestantes (Figura 39 A e B). Quando comparamos a expressão do NIK em gestantes ou não, apenas para o grupo incubado com o lopinavir das mulheres gestantes mostrou menor expressão do NIK do que o das mulheres não gestantes (Figura 40).

No anexo 3 encontram-se imagens representativas do histograma de avaliação da molécula NIK em neuroblastoma.

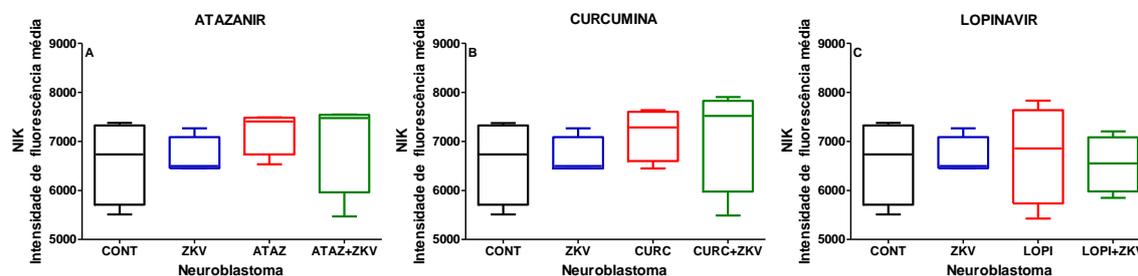


Figura 38- Comparação do efeito dos 3 tratamentos, atazanavir, curcuma e lopinavir na expressão da molécula NIK, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas infectados ou não com vírus zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- Atazanavir, $p= 0,2404^2$; B- Curcuma, $p= 0,4125^2$; C- Lopinavir, $p= 0,9742^2$. Na análise separada dos tratamentos, não houve diferença entre os grupos. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: 2 Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

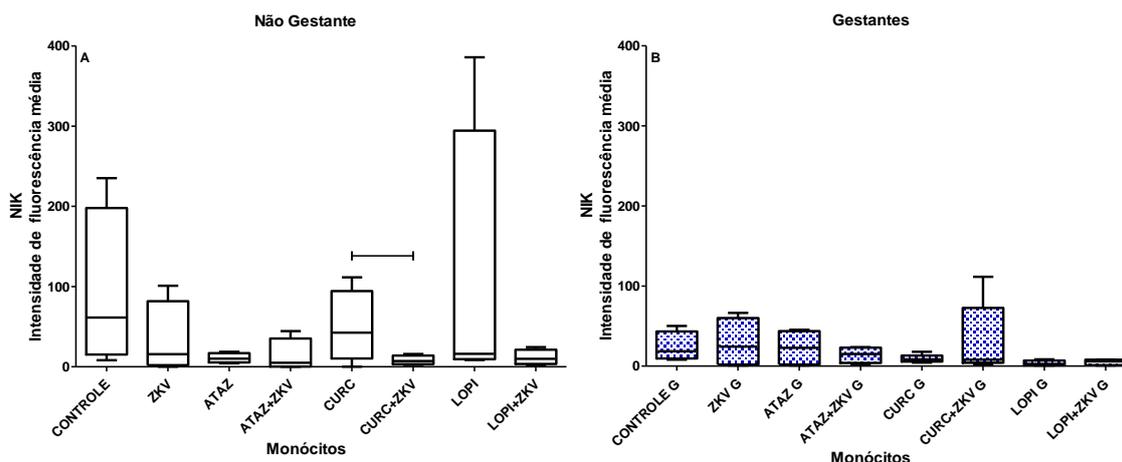


Figura 39- Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcuma e lopinavir na expressão da molécula NIK avaliada pela Intensidade de Fluorescência Média nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- NIK NG, $p= 0,3266^2$; B- NIK G, $p= 0,3908^2$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: 2 Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunne e test t ou Mann-Whitney.

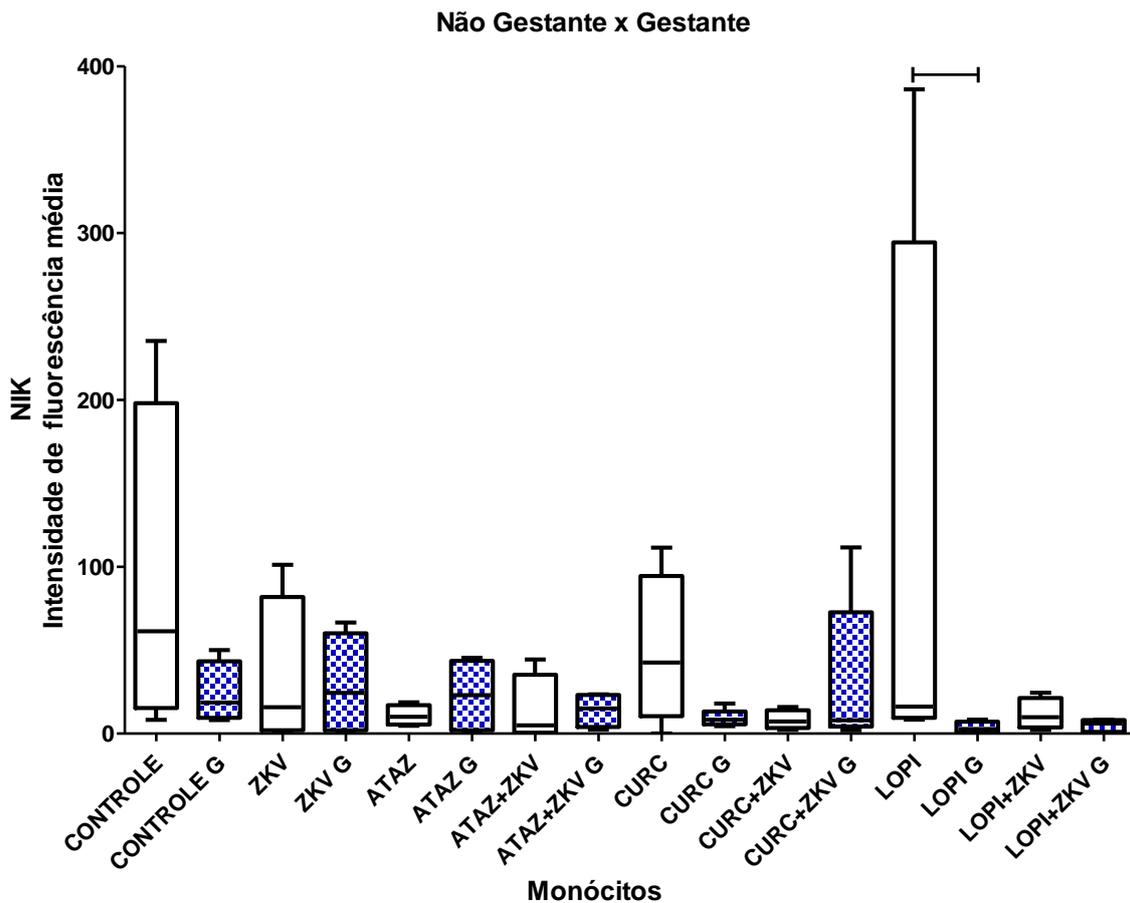


Figura 40- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula NIK nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) X gestantes (G), infectados ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. p= 0,3136². As diferenças estatísticas estão representadas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.4.5 JNK

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na da expressão da molécula JNK, em neuroblastomas e monócitos incubados ou não com vírus Zika

Observamos que a infecção pelo vírus Zika não modificou a expressão do JNK (Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, p=0,1042). Das três drogas testadas, apenas o lopinavir aumentou a expressão do JNK tanto quando foi tratado com o lopinavir isoladamente, quanto quando incubado com o vírus e tratado com a droga (grupos C x LOPI e C x LOPI+ZKV) (Figura 41 C). Os tratamentos com o atazanavir e com a curcumina não modificaram a expressão da molécula JNK (Figura 41 A, B).

Não houve diferença estatística na expressão do JNK entre mulheres não gestantes ou gestantes nem pela incubação com o vírus Zika, nem com o tratamento com o atazanavir, curcumina ou lopinavir (Figura 42A e B). Como também quando comparamos a expressão dessa molécula entre mulheres gestantes ou não (Figura 43).

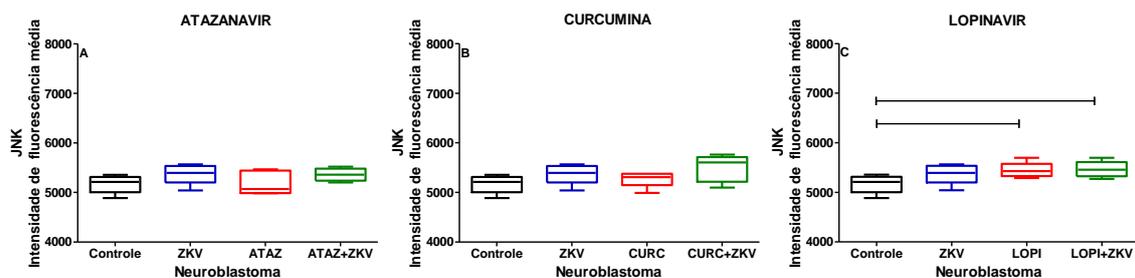


Figura 41- Comparação do efeito dos 3 tratamentos, atazanavir, curcumina e lopinavir, na expressão do JNK, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas infectados ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- Atazanavir, $p=0,2220^1$; B- Curcumina, $p=0,1261^2$; C- Lopinavir, $p=0,0609^1$. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras na figura C. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

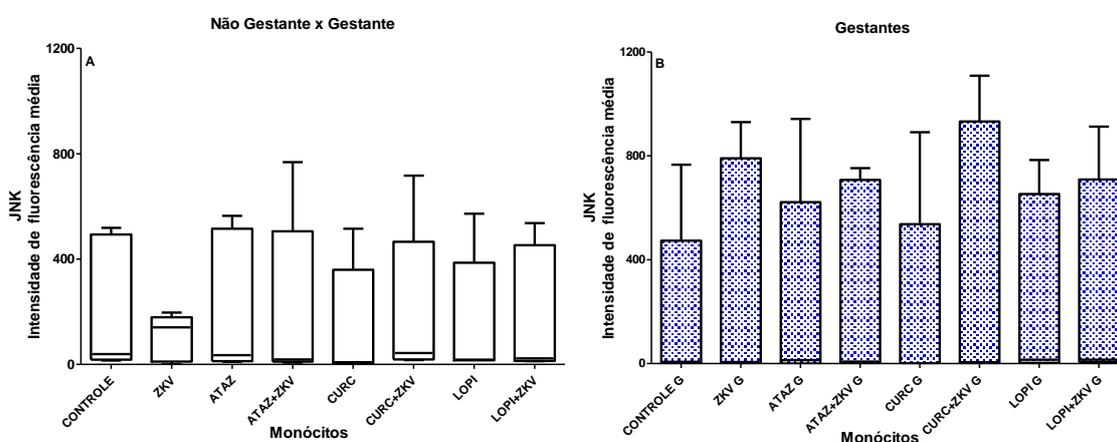


Figura 42- Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula JNK, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média, nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- JNK NG, $p=0,9278^2$; B- JNK G, $p=0,9939^2$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

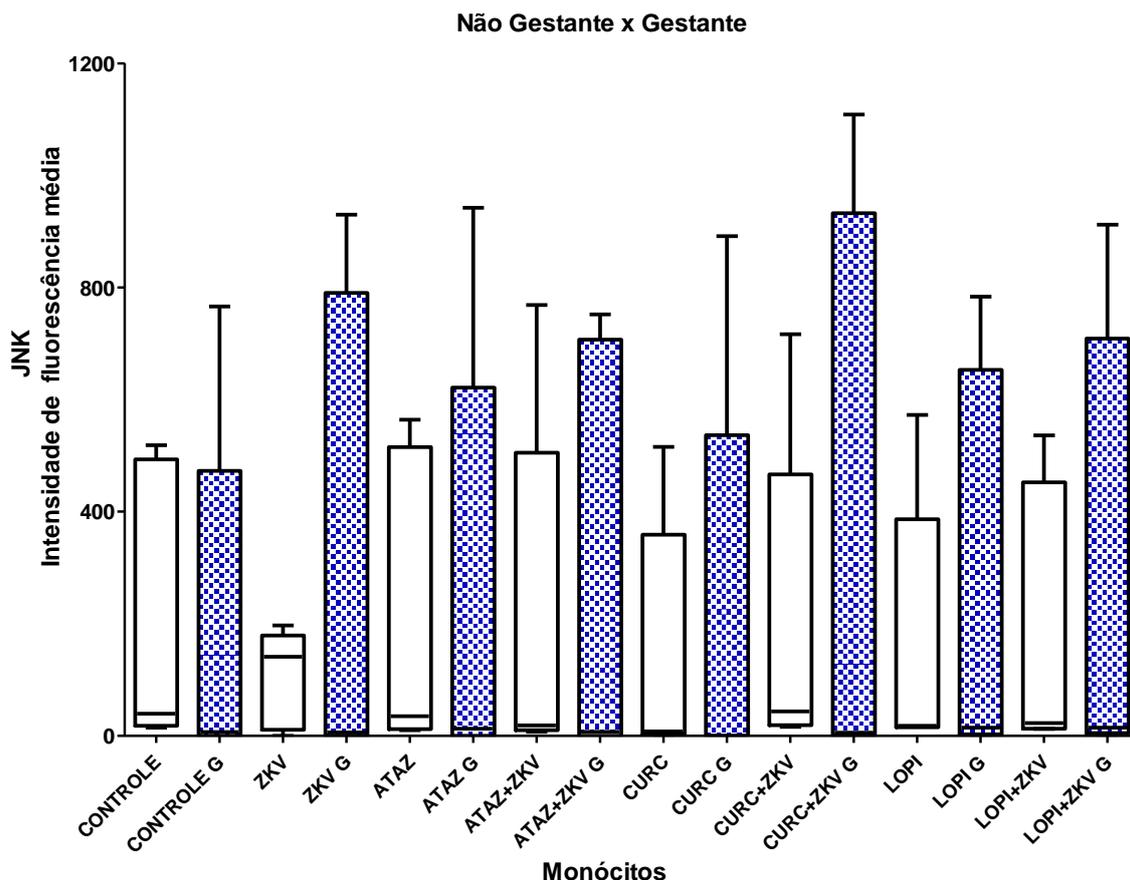


Figura 43- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula JNK nos monócitos de mulheres não gestantes (NG) X gestantes (G), incubados ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. p= 0,9934². Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.4.6 Comparação entre a expressão do NIK e JNK

Pela comparação entre a expressão do NIK versus JNK nos neuroblastomas, observamos maior expressão da molécula NIK do que do JNK (Figura 44 e 45). Pela análise individual entre as duas moléculas para cada grupo, observamos que houve maior expressão do JNK nos grupos Controle, ZIKA, ATZ, CURC, ATZ+ZIV e LOPI+ZKV. Entretanto, os valores de ambas as moléculas são elevados, mostrando que ambas as vias são expressas, mas com predominância do NIK.

Pela comparação entre a expressão do JNK *versus* NIK, observamos que não houve diferença significativa na comparação isolada dos grupos (figura 46 A-H). Pela análise dos grupos das não gestantes e gestantes de forma conjunta, não houve diferença entre elas, que mantiveram o mesmo padrão de expressão na presença do vírus e com os tratamentos com as drogas, exceto para o grupo Curc+ZKV, no qual houve menor expressão do NIK do que do JNK (Figura 47).

Em conclusão, a incubação com o vírus Zika não modificou a expressão de NIK e JNK nos neuroblastomas (Figuras 38 e 41). Entretanto, nos neuroblastomas o NIK foi muito mais expresso do que o JNK, tanto basal como em todos os tratamentos estudados (Figuras 45). Nos neuroblastomas, o lopinavir isoladamente ou na incubação com o vírus aumentou a expressão do JNK, em relação ao basal (Lopi e Lopi+ZKV > CONT) (Figura 35). Nos monócitos das não gestantes e das gestantes não houve modificação dos níveis de expressão de JNK (figura 42).

Não houve diferença na expressão do NIK na situação basal e nem após a incubação com o vírus Zika e nos três tratamentos utilizados nos monócitos das mulheres não gestantes ou gestantes (Figura 39). Entretanto, diferentemente dos neuroblastomas, observamos que os monócitos não mostraram diferenças na expressão de NIK e JNK no basal das gestantes e das não gestantes (Figura 40). Nos monócitos das gestantes incubadas concomitantemente com a curcumina e com o vírus Zika houve maior expressão de JNK do que do NIK (Figura 46). Na comparação dos grupos das não gestantes *versus* os grupos de gestante, apenas o lopinavir das não gestantes expressou maior produção de NIK do que as gestantes (Figura 47). A molécula JNK não apresentou diferença estatística entre os grupos das não gestantes, o que se repetiu entre os grupos das gestantes (Figura 42). A intensidade de fluorescência média tanto do NIK quanto do JNK foi mais intensa nos neuroblastomas do que nos monócitos.

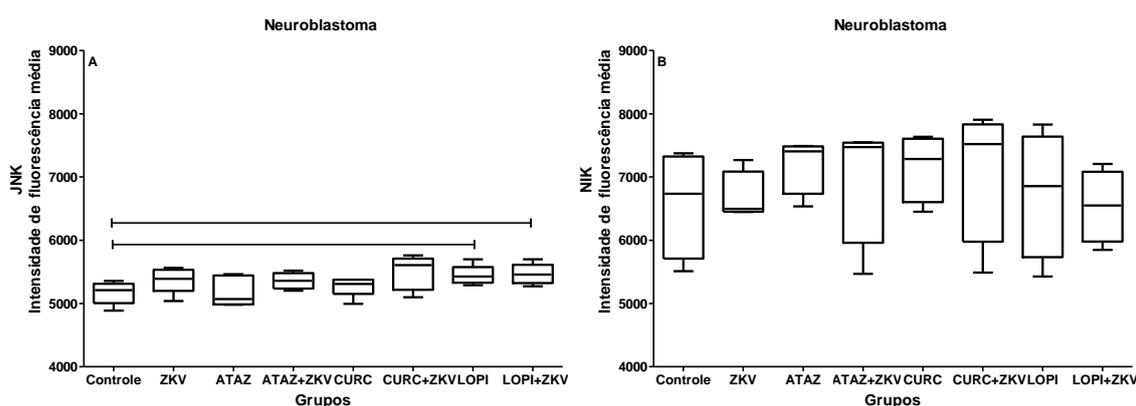


Figura 44- Comparação da expressão da molécula JNK (A) e da molécula NIK (B), expressa pela Intensidade de Fluorescência Média entre os grupos de estudo, avaliados por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- JNK, $p= 0,1042^2$; B- NIK, $p= 0,5253^2$. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras na figura A. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn

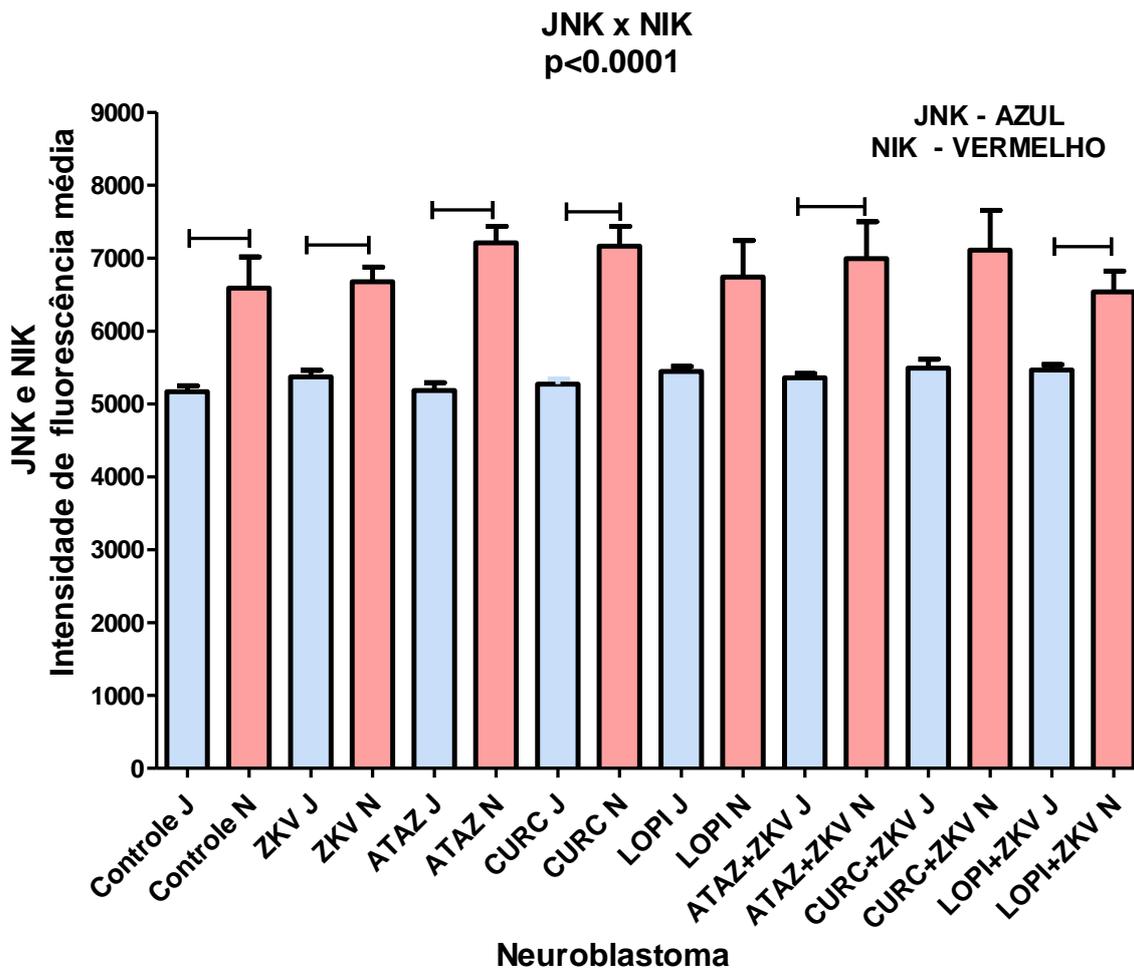


Figura 45 Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão das moléculas JNK versus NIK, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neoblastomas infectados ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. $p = p < 0.0001^2$ e nas comparações individuais, Cont J X Cont N, $p = 0,0159^4$; ZKV J X ZKV N, $p = 0,0159^4$; ATAZ J X ATAZ N, $p < 0.0001^3$; CURC J X CURC N, $p = 0,0159^4$; LOPI J X LOPI N, $p = 0,1111^4$; ATAZ+ZKV J X ATAZ+ZKV N, $0,0317^4$; CURC+ZKV J X CURC+ZKV N, $p = 0,1111^4$; LOPI+ZKV J X LOPI+ZKV N, $p = 0,0159^4$. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Testes: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, ³Teste t e ⁴Mann Whitney.

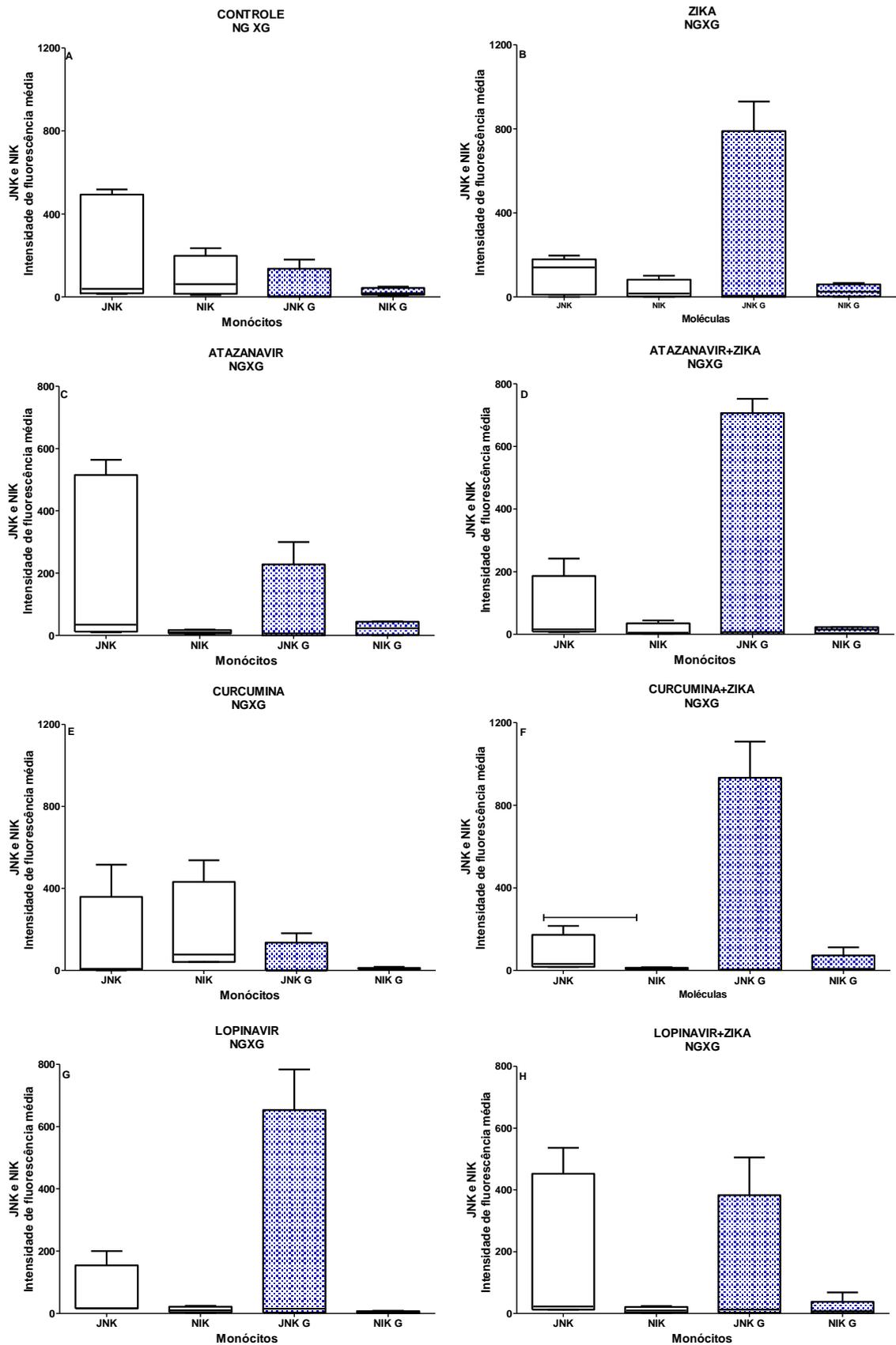


Figura 46- Comparação da Intensidade de Fluorescência Média das moléculas JNK e NIK entre as não gestantes e gestantes em cada grupo de estudo, avaliados por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- Controle, $p = 0,1888^2$; B- Zika, $p = 0,7942^2$; C- Atazanavir, $p = 0,3299^2$; D- Atazanavir+Zika, $p = 0,7815^2$; E- Curcumina, $p = 0,1344^2$; F- Curcumina+Zika, $p = 0,4161^2$; G-

Lopinavir, $p= 0,1194^2$; H- Lopinavir+Zika, $p= 0,1830^2$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: 2 Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

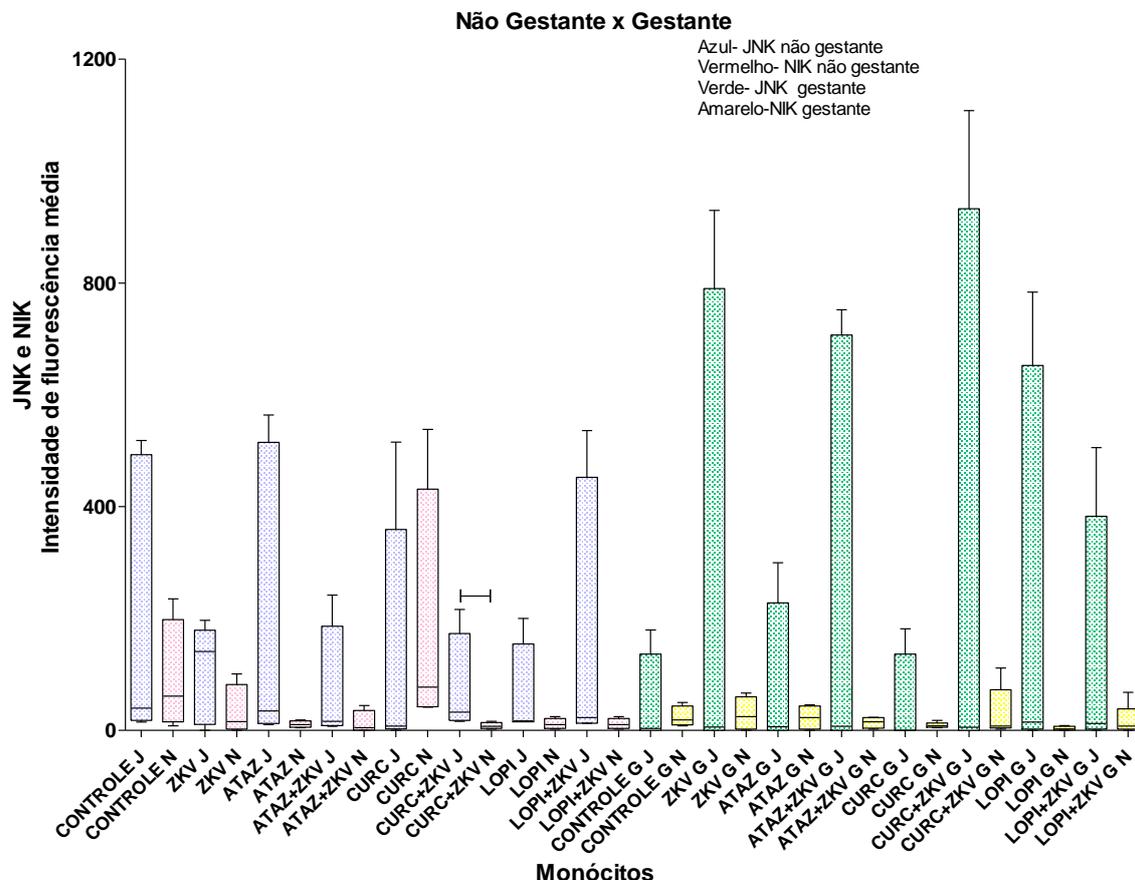


Figura 47- Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir, na Intensidade de Fluorescência Média das moléculas JNK e NIK nos monócitos infectados ou não com vírus Zika das não gestantes e das gestantes, avaliado por citometria de fluxo. $n = 5$ por grupo. $p = 0,4419^2$. As diferenças estatísticas estão representadas pelas barras. Teste: 2 Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.4.7 I κ B

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula I κ B, em neuroblastomas e monócitos de gestantes incubados ou não com vírus Zika.

A molécula I κ B tem papel importante e decisivo na ativação da via do NF- κ B, pois é por meio de sua fosforilação que ocorre a liberação das moléculas da via do NF- κ B que migram para o núcleo celular e com conseqüente ativação ou repressão dos genes alvos.

A incubação do vírus Zika com os neuroblastomas aumentou significativamente a expressão do I κ B (ANOVA, seguido pelo método de Tukey, $p= 0,0317$) (figura 48).

Na análise individualizada por tratamento (figura 49 A, B e C), verificamos que nenhuma das drogas isoladamente modificou a expressão do I κ B. Entretanto, quando a droga estava associada ao vírus, verificamos que para a curcumina e para o lopinavir a expressão do I κ B foi maior do que a do grupo controle, porém não foi diferente daquela do grupo apenas infectado pelo vírus, mostrando que essas drogas não foram capazes de modificar o efeito do vírus sobre os neuroblastomas.

Em conclusão, a infecção pelo vírus Zika aumentou a expressão de I κ B, porém a incubação conjunta com o atazanavir e a curcumina não modificou o efeito do vírus sobre a célula.

Não observamos nenhuma diferença estatística na expressão de I κ B pelos monócitos do sangue periférico para as não gestantes (Figura 50A) e também para as gestantes (figura 50B). A comparação entre não gestante e gestante também não mostrou diferença estatística na expressão do I κ B (figura 51).

No anexo 4 encontra-se imagem representativa do histograma de avaliação da molécula I κ B em neuroblastoma.

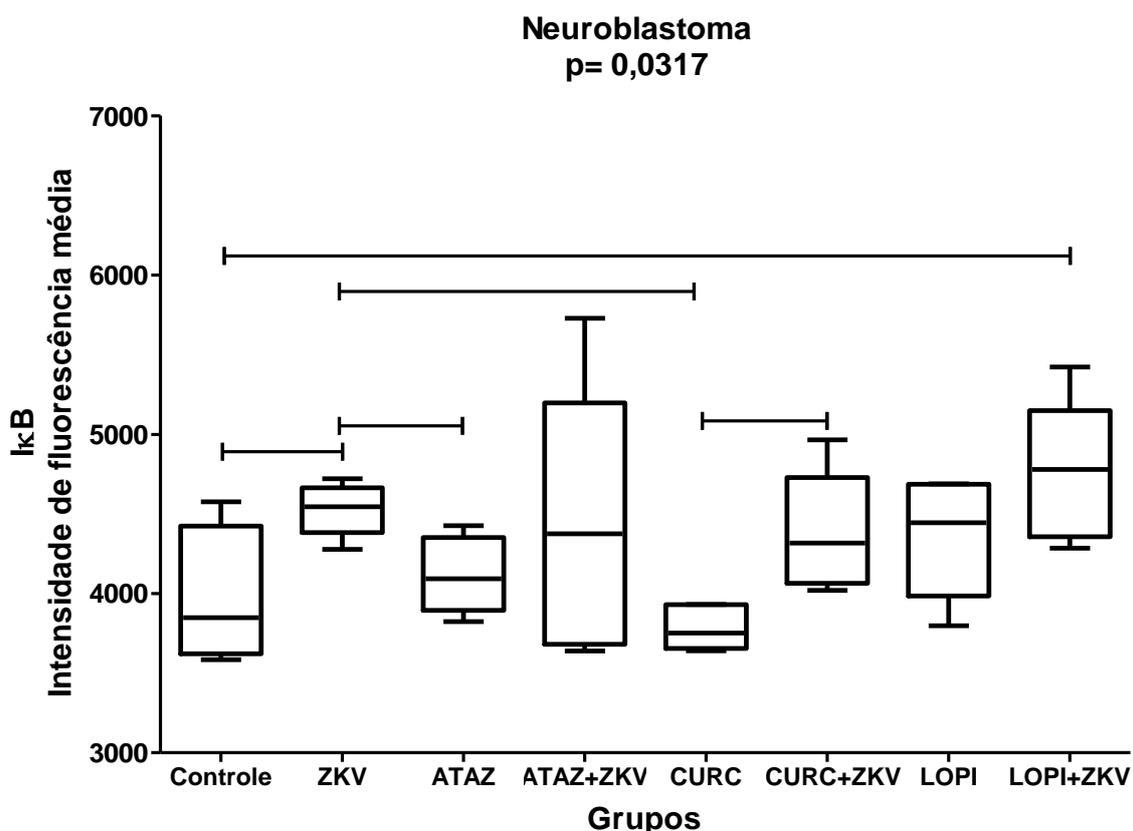


Figura 48- Avaliação geral do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na Intensidade de Fluorescência Média da molécula I κ B nos neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. As diferenças significativas entre os grupos estão mostradas pelas barras, p= 0,0317¹. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

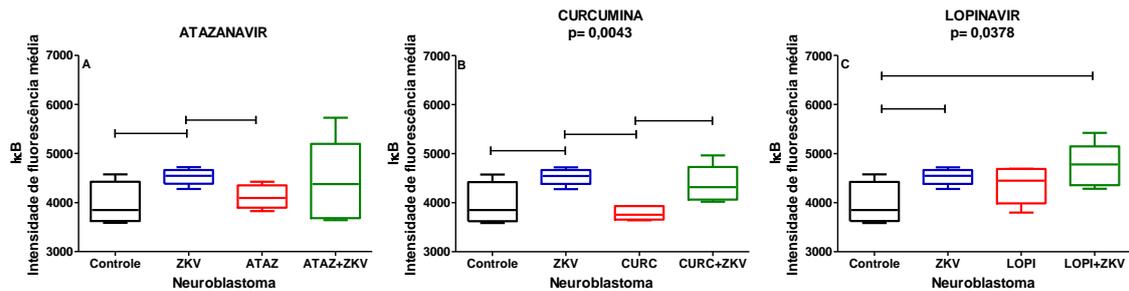


Figura 49- Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula I κ B, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média, nos neuroblastomas incubados ou não com vírus zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- Atazanavir, p= 0,2003²; B- Curcumina, p= 0,0043¹; C- Lopinavir, p= 0,0378¹. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

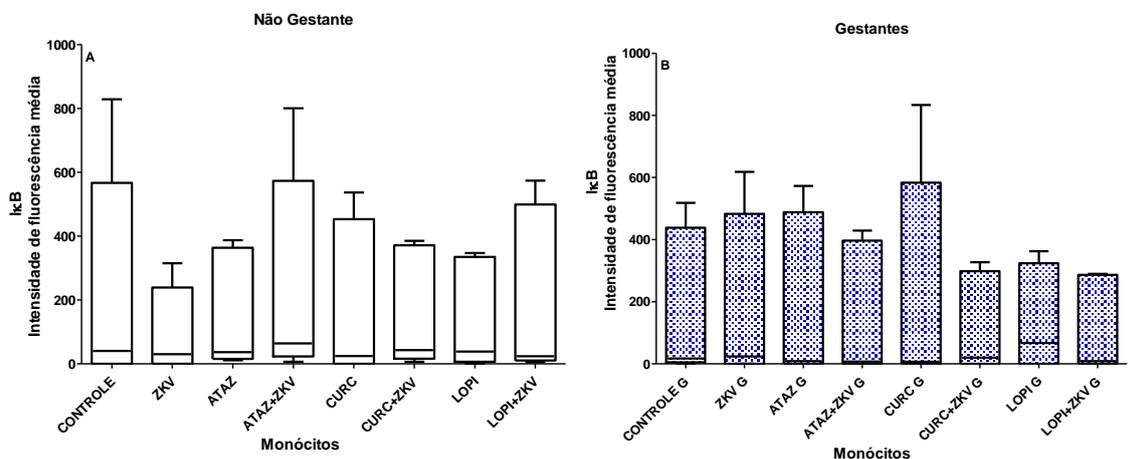


Figura 50- Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula I κ B, expressa como Intensidade de Fluorescência Média, nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) infectadas ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- I κ B NG, p= 0,9515²; B- I κ B G, p= 0,9912². Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

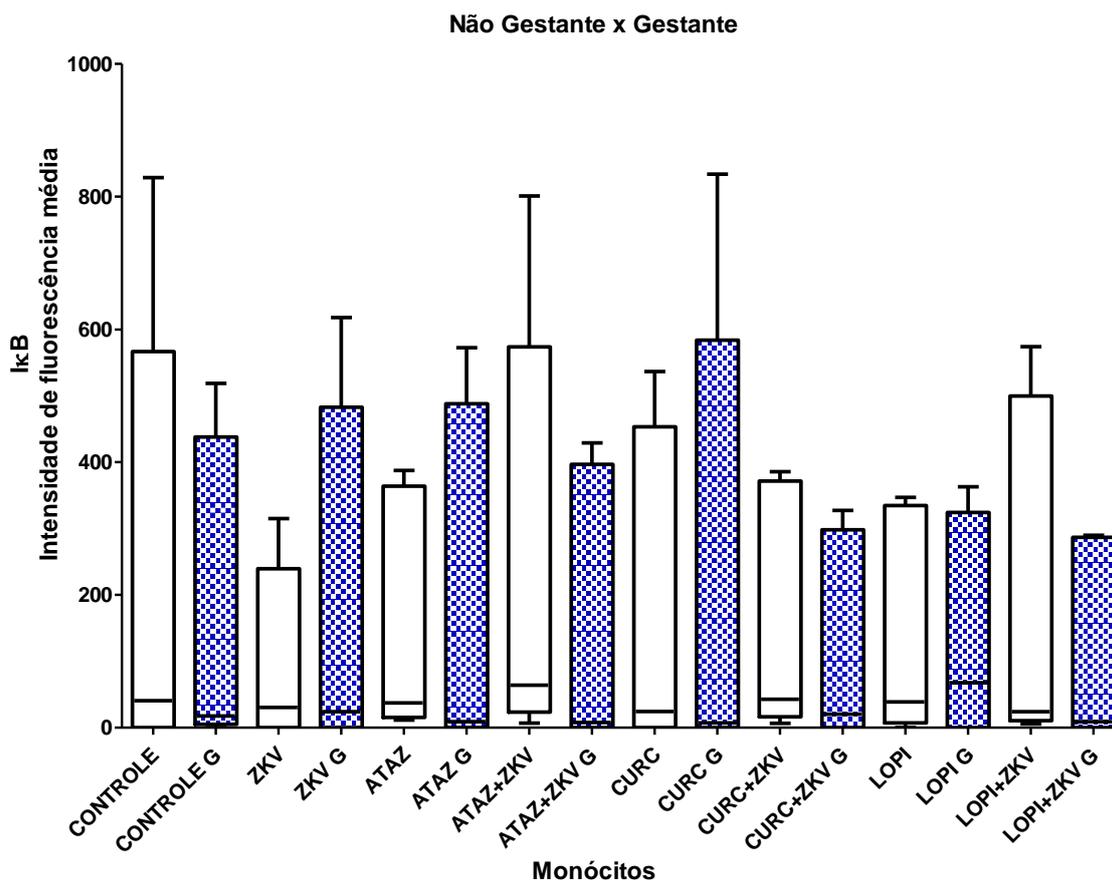


Figura 51- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula IκB nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G), infectadas ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. p = 0,9965². Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.5 MOLÉCULAS FINAIS DA VIA DO NF-κB EM EM NEUROBLASTOMA SK-N-BE (2) E MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE GESTANTE.

4.5.1 relA

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula relA, em neuroblastomas e monócitos incubados ou não com vírus Zika.

A infecção pelo vírus Zika dos neuroblastomas não modificou a expressão do relA (Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, p= 0,0673) (Figura 52). Na análise individualiza por tratamento (Figura 53 A, B e C), verificamos que nenhuma das drogas isoladamente modificou estatisticamente a expressão do relA, mesmo quando estava associada ao vírus.

A incubação *in vitro* com o vírus Zika dos monócitos do sangue periférico de mulheres gestantes aumentou significativamente a expressão do relA (Figura 54B). Embora tenha ocorrido aumento da expressão do relA nas mulheres não gestantes, esse aumento não foi estatisticamente significativo. (Figura 54A). Nas células das mulheres gestantes incubadas com o vírus Zika e tratadas com a curcumina também houve aumento significativo da expressão do relA (Figura 54 B), mas isso não foi observado nas células das mulheres controles não gestantes (Figura 54 A).

Quando analisamos comparativamente no mesmo grupo mulheres não gestantes e gestantes, apenas no grupo tratado com a curcumina e incubado com o vírus Zika houve maior expressão estatisticamente significativa do relA no grupo das mulheres gestantes (Figura 55).

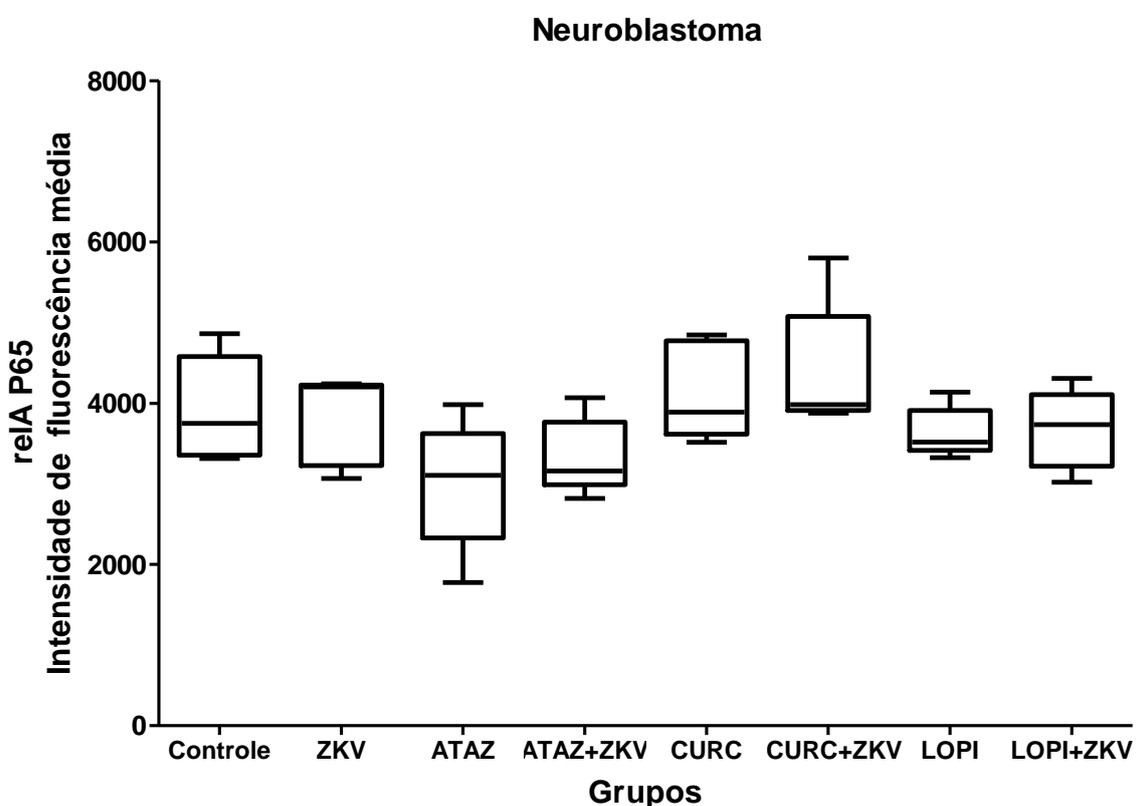


Figura 52- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão do relA, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A análise comparada de todos os grupos foi $p = 0,0673^2$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

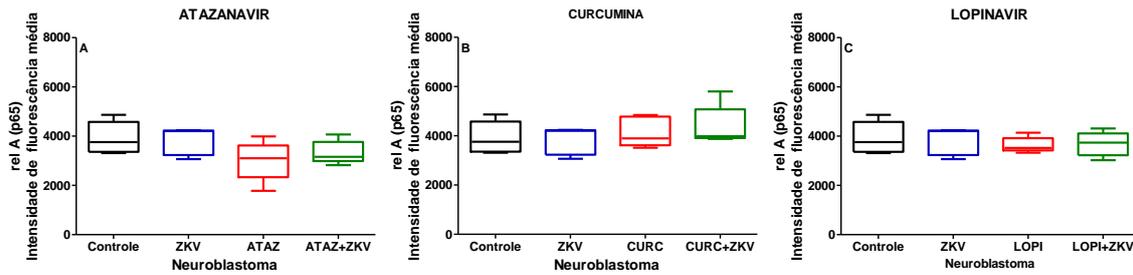


Figura 53- Comparação do efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula relA, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- Atazanavir, $p = 0,0963^2$; B- Curcumina, $p = 0,6555^2$; C- Lopinavir, $p = 0,8938^2$. Na análise separada dos tratamentos, não houve diferença entre os grupos. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

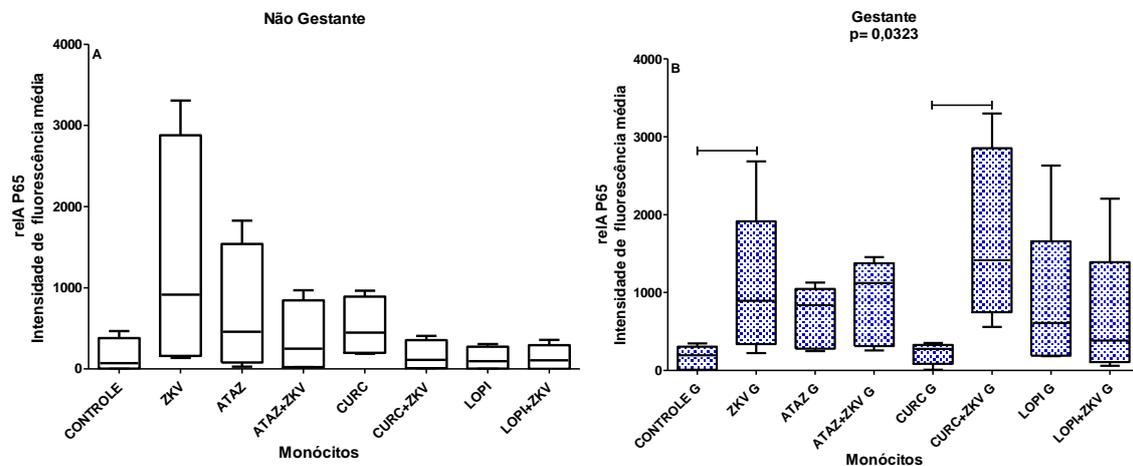


Figura 54-Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula rel A pelos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) infectadas ou não com vírus Zika, expresso pela Intensidade de Fluorescência Média, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- rel A NG, $p = 0,1438^1$; B- rel A G, $p = 0,0323^2$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. As diferenças estatísticas estão representadas pelas barras. Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

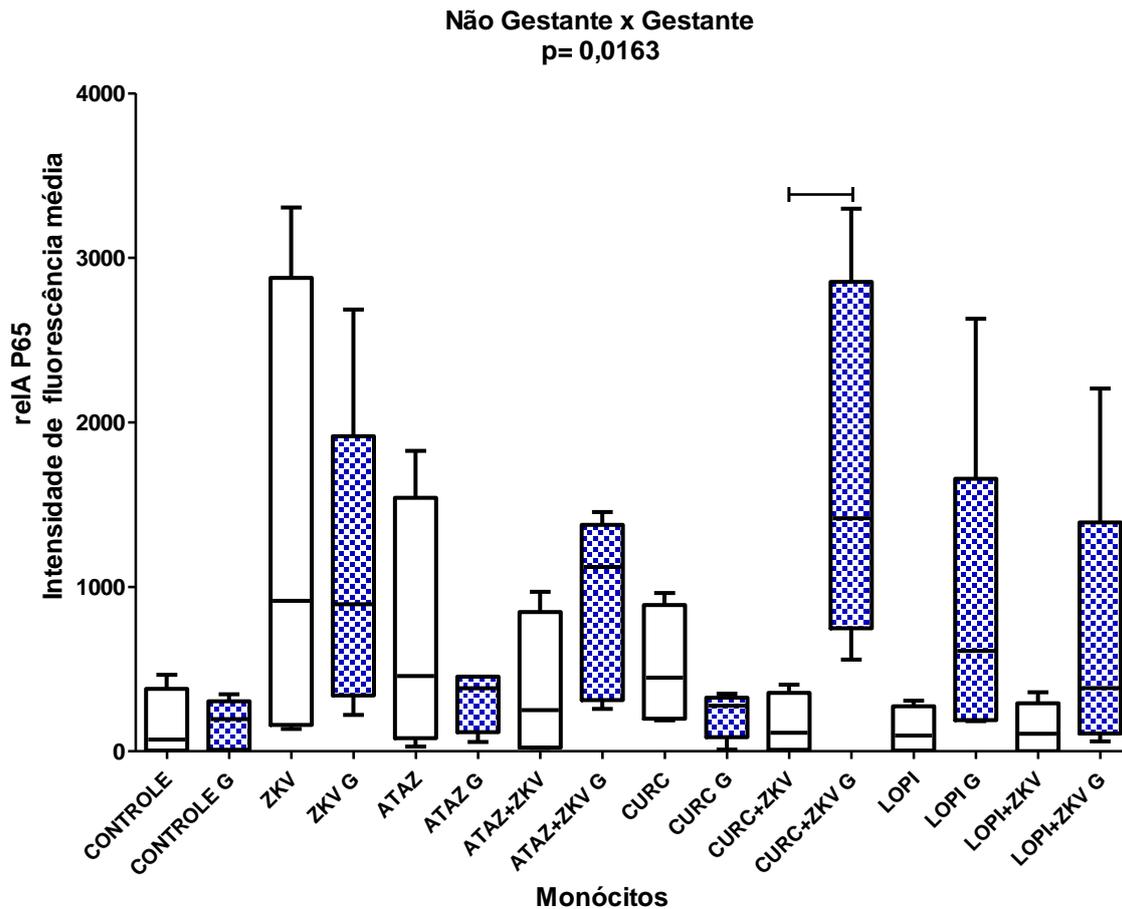


Figura 55- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula rel A pelos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) versus gestantes (G), incubadas ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. p= 0,0163². Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.5.2 relB

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula relB, em neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika.

A incubação do vírus Zika com os neuroblastomas não modificou a expressão do relB (Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, p= 0,9143) (Figura 56). Na análise individualizada por tratamento (Figura 57 A, B e C), verificamos que nenhuma das drogas isoladamente modificou a expressão do relB, mesmo na presença do vírus.

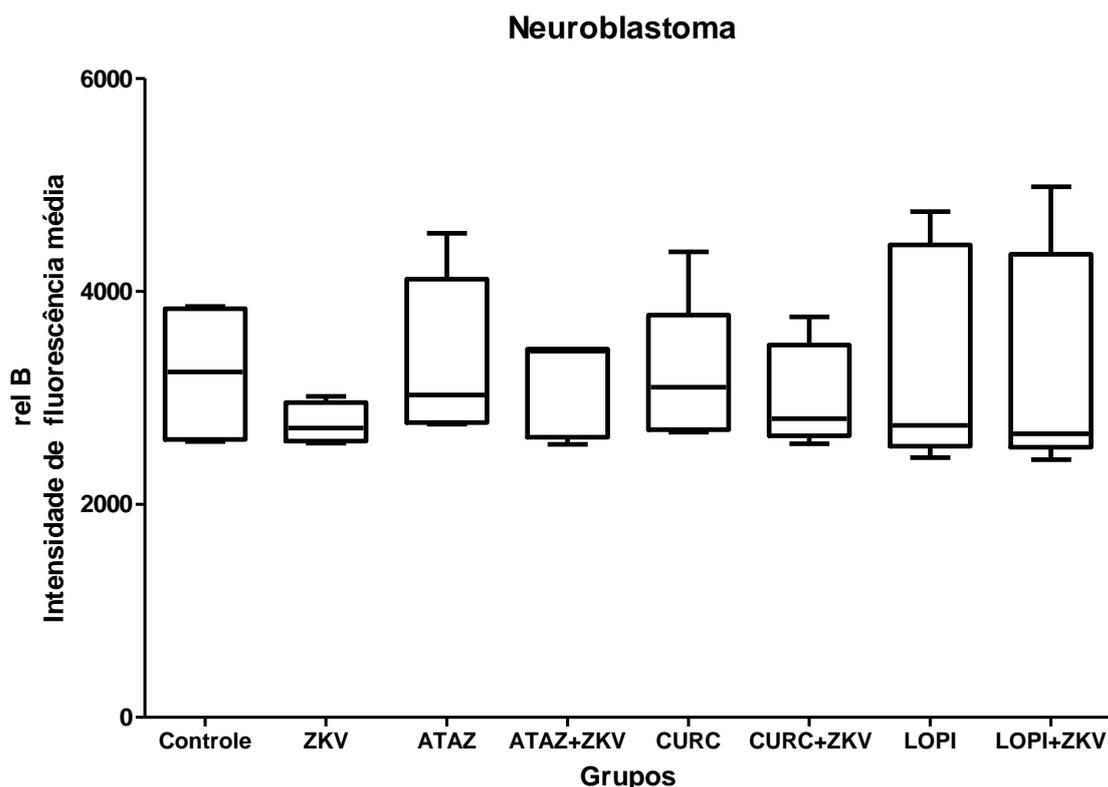


Figura 56- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula rel B, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. O valor do p pela análise comparativa de todos os grupos foi $p=0,9143^2$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

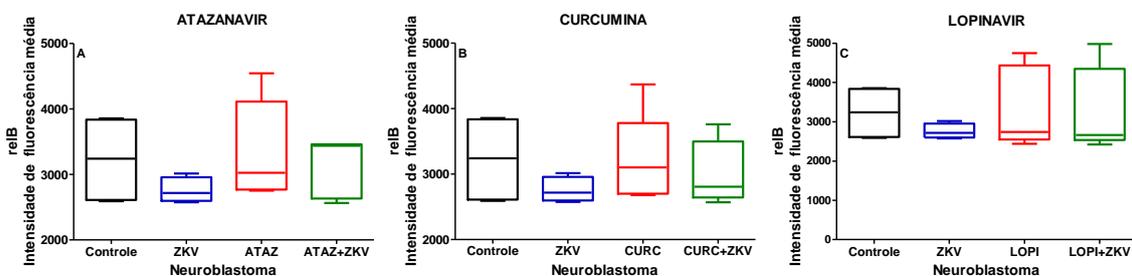


Figura 57- Comparação do efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula rel B, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- Atazanavir, $p= 0,4246^2$; B- Curcumina, $p= 0,5574^2$; C- Lopinavir, $p= 0,9301^2$. Na análise separada dos tratamentos, não houve diferença entre os grupos. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

Não houve diferença estatística entre os grupos, nem para as mulheres gestantes, nem para as não gestantes (Figura 58 A e B). Pela análise comparativa de cada grupo entre gestantes e não gestantes, também não houve diferença estatística. Entretanto, observa-se uma distribuição dos dados bem mais ampla nos grupos das mulheres

gestantes do que das não gestantes, que mostrou uma distribuição bem mais restrita (Figura 59).

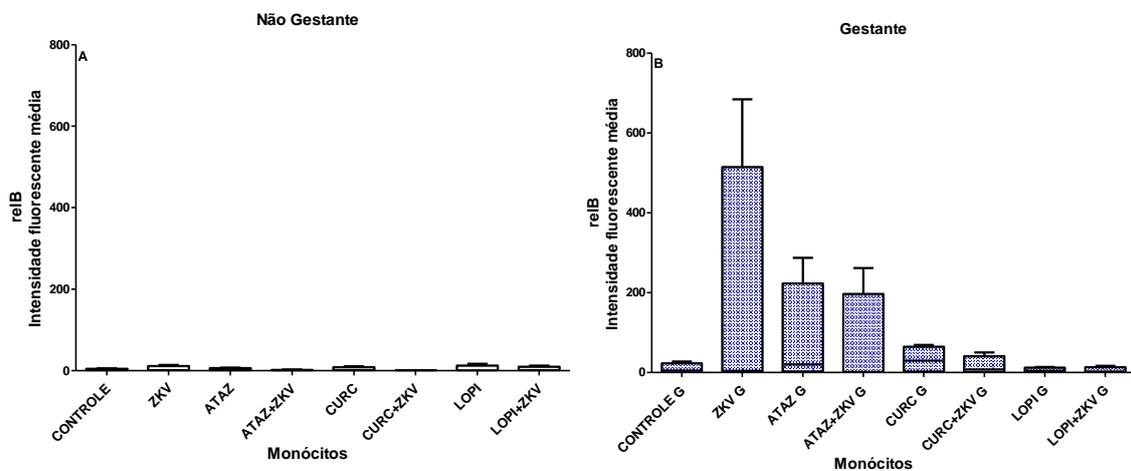


Figura 58- Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula rel B nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) infectadas ou não in vitro com vírus Zika, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- rel B NG, $p=0,9514^2$; B- rel B G, $p=0,8019^2$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

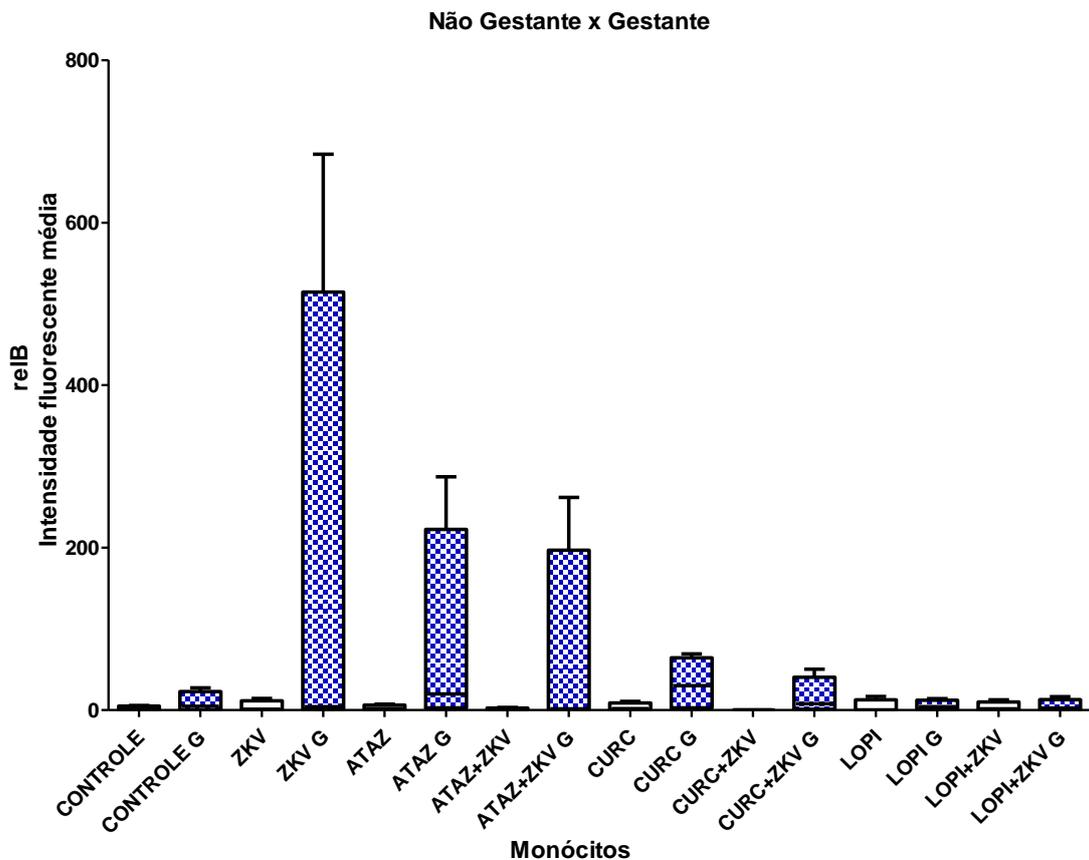


Figura 59- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula rel B nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) versus gestantes (G), incubadas ou não in vitro com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. $p=0,6329^2$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.5.3 c-Rel

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula c-Rel, em neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika.

Quando comparamos as respostas pelas drogas (figuras 60 A, B e C), de forma individualiza, observamos que no grupo tratado pelo ATZ e infectado pelo vírus Zika (ATZ+ZKV) houve menor expressão do c-Rel do que no grupo apenas tratado pelo ATZ (Figura 60A). Não houve diferença entre os grupos dos demais tratamentos.

Não houve diferença estatística na expressão do c-Rel pelas células de não gestantes (figura 61A) e gestantes (figura 61B) nos grupos estudados. Quando comparamos as respostas dos grupos de não gestantes e das gestantes (figura 62), também não houve diferenças estatísticas.

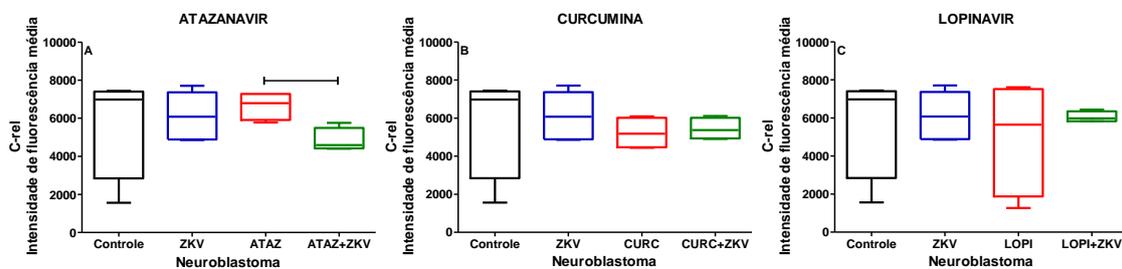


Figura 60- Comparação do efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula c-Rel; expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados ou não com vírus zika, avaliado por citometria de fluxo. n =5 por grupo. As diferenças estão representadas pelas barras na figura A. A- Atazanavir, $p= 0,1399^2$ e $p<0,05$, Mann-Whitney; B- Curcumina, $p= 0,4900^2$; C- Lopinavir, $p= 0,9012^2$. Na análise separada dos tratamentos, não houve diferença entre os grupos. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: 2 Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

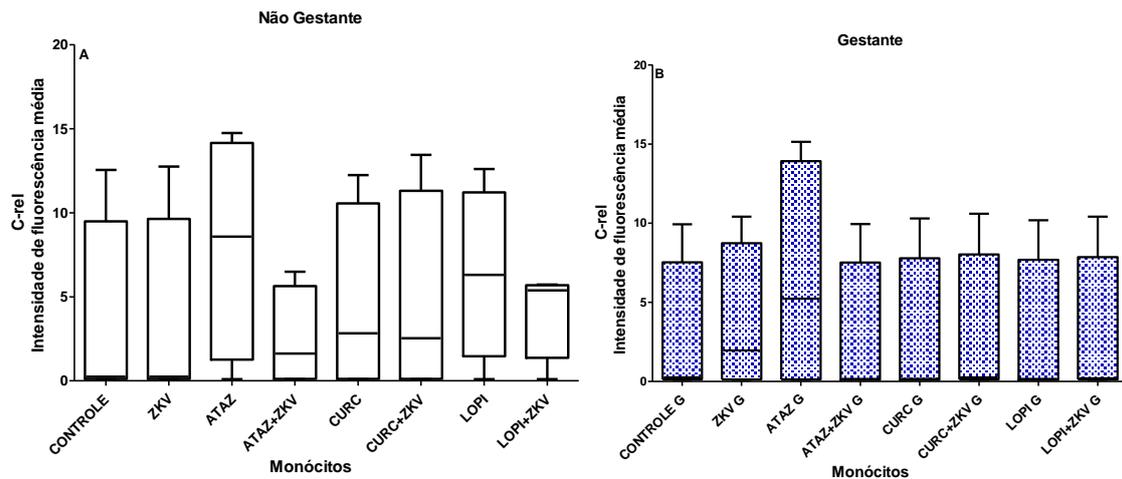


Figura 61- Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula c-Rel nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) infectadas ou não in vitro com vírus zika, expressos pela Intensidade de Fluorescência Média, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- c-Rel NG, $p= 0,9670^2$; B- c-Rel G, $p= 0,9355^2$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: 2 Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

Não Gestante x Gestante

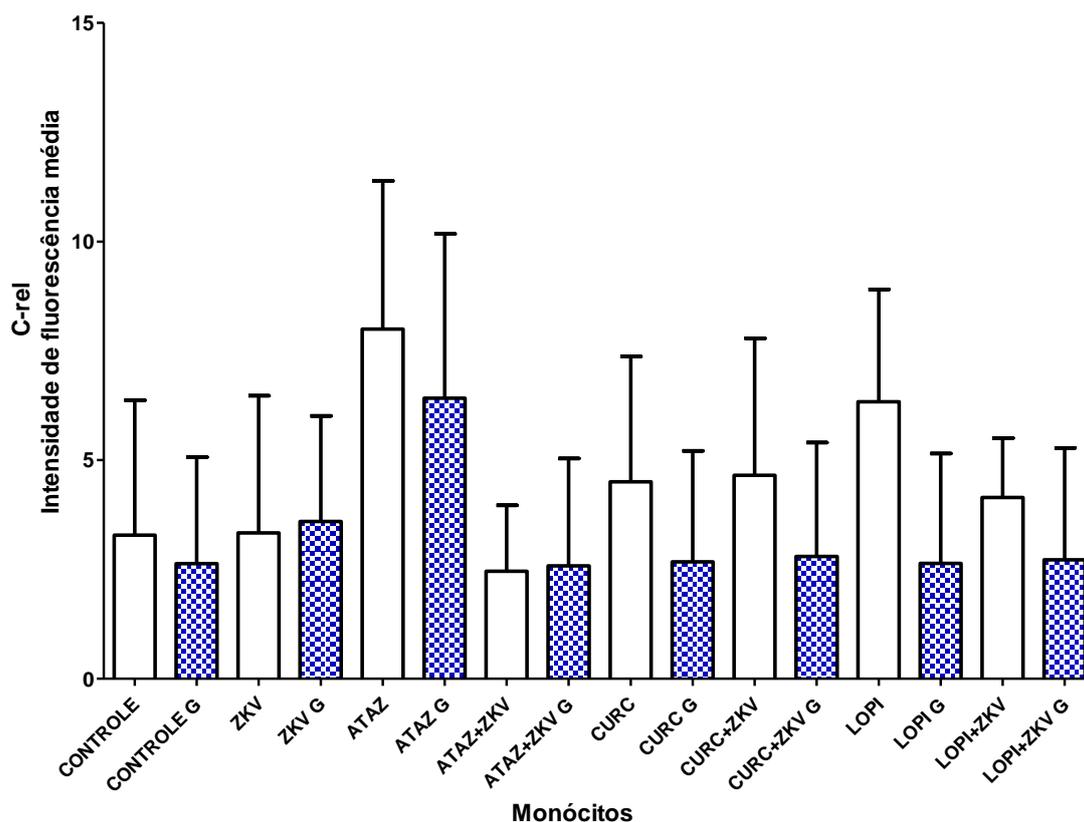


Figura 62- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula c-Rel nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) versus gestantes (G), incubadas ou não in vitro com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. p= 0,9902². Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.5.4 p50

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p50, em neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika.

Quando analisamos as respostas pelas drogas (figuras 63 A, B e C) de forma individualiza, observamos que a curcumina e o lopinavir aumentaram a expressão do p50 nos neuroblastomas incubados com o vírus (ANOVA, seguido pelo método de Tukey, p= 0,0488 e p= 0,0351, respectivamente), (figura 63 B e C).

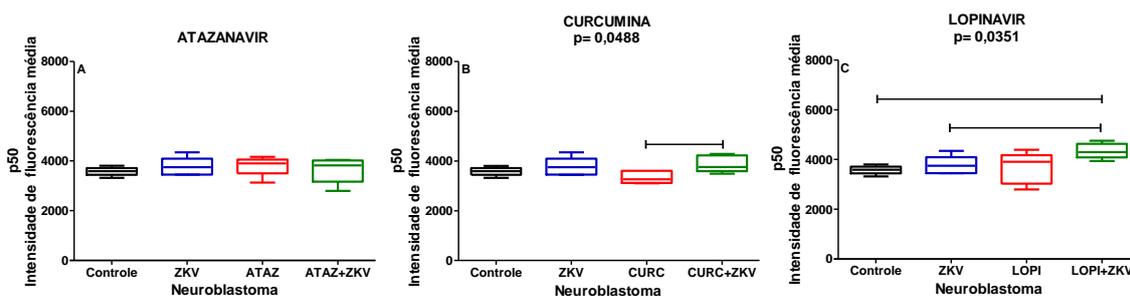


Figura 63- Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p50; expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados

ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. $n = 5$ por grupo. As diferenças estão representadas pelas barras na figura C. A- Atazanavir, $p = 0,5208^2$; B- Curcumina, $p = 0,0488^1$; C- Lopinavir, $p = 0,0351^1$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: 2 Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn e 1 ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

A análise da expressão do p50 pelas células mononucleares do sangue periférico de gestantes (Figura 64 A) e das não gestantes (Figura 64B) não mostrou diferença estatística entre seus grupos. A comparação entre os grupos de estudo das não gestantes versus gestantes também não teve significância estatística (figura 65).

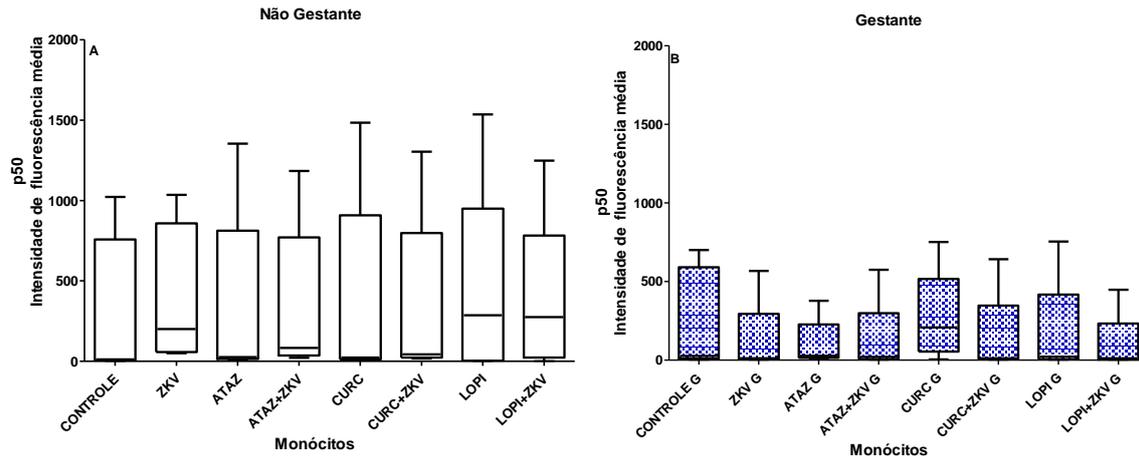


Figura 64- Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p50 nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas ou não in vitro com vírus Zika, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média, avaliado por citometria de fluxo. $n = 5$ por grupo. A- p50 NG, $p = 0,9684^2$; B- p50 G, $p = 0,7485^2$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: 2 Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

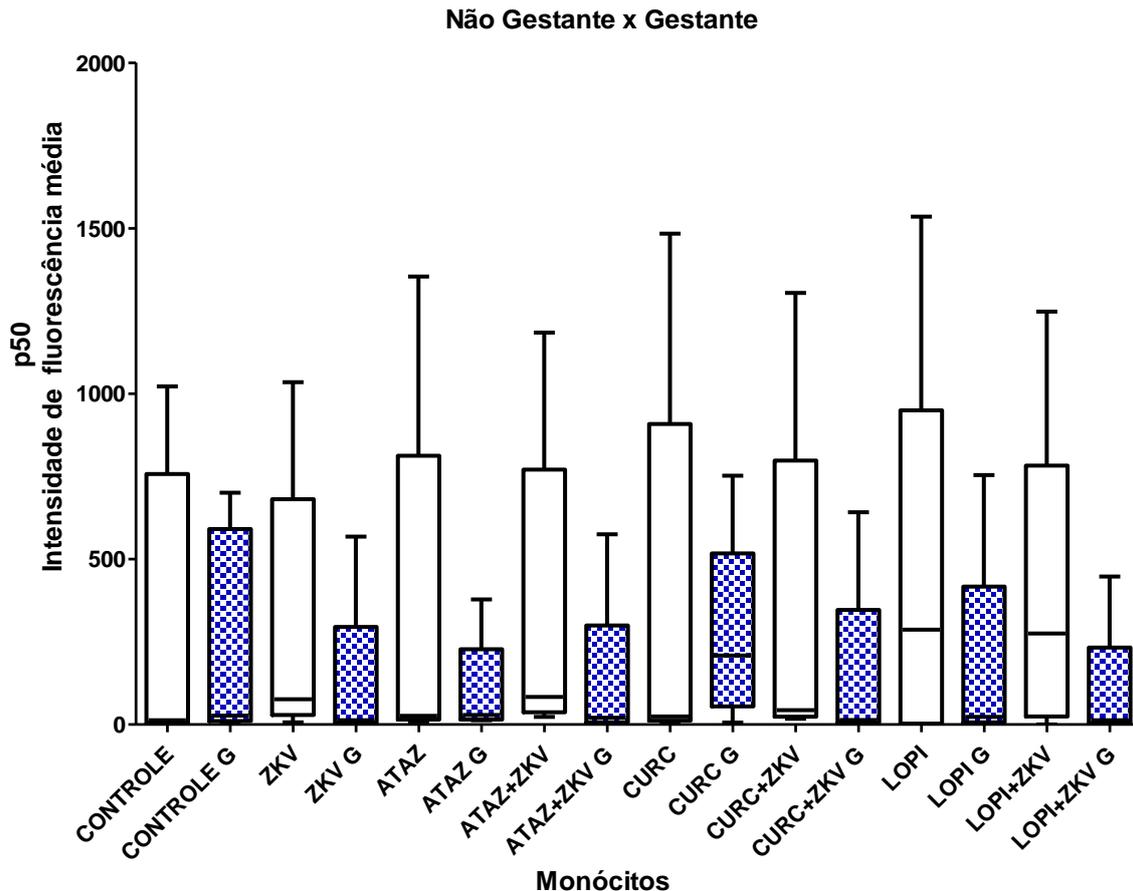


Figura 65- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p50 nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) versus gestantes (G), incubadas ou não in vitro com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. p= 0,9131². Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.5.5 p52

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p52, em neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika.

Quando comparamos as respostas pelas drogas (figuras 66 A, B e C) de forma individualizada, observamos que houve aumento da expressão do p52 no grupo tratado com as três drogas e incubados com o vírus Zika; para o atazanavir ANOVA, seguido pelo método de Tukey, p= 0,0426; para a curcumina e para o lopinavir, p<0,05, teste t).

Na avaliação da expressão da molécula p52 pelas células mononucleares, não houve diferença estatística entre os grupos das células provenientes das não gestantes (figura 67A) e das gestantes (figura 67B) e quando a comparação foi feita entre cada grupo individualmente, os grupos não gestantes versus gestantes, também não houve diferenças significantes (figura 68).

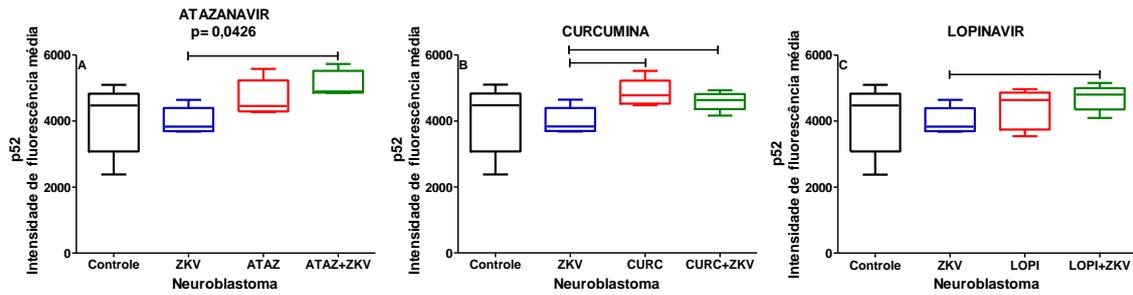


Figura 66- Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p52, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média nos neuroblastomas incubados ou não com vírus Zika, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. As diferenças estão representadas pelas barras. A- Atazanavir, $p= 0,0426^1$; B- Curcumina, $p= 0,0780^2$; C- Lopinavir, $p= 0,3530^1$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

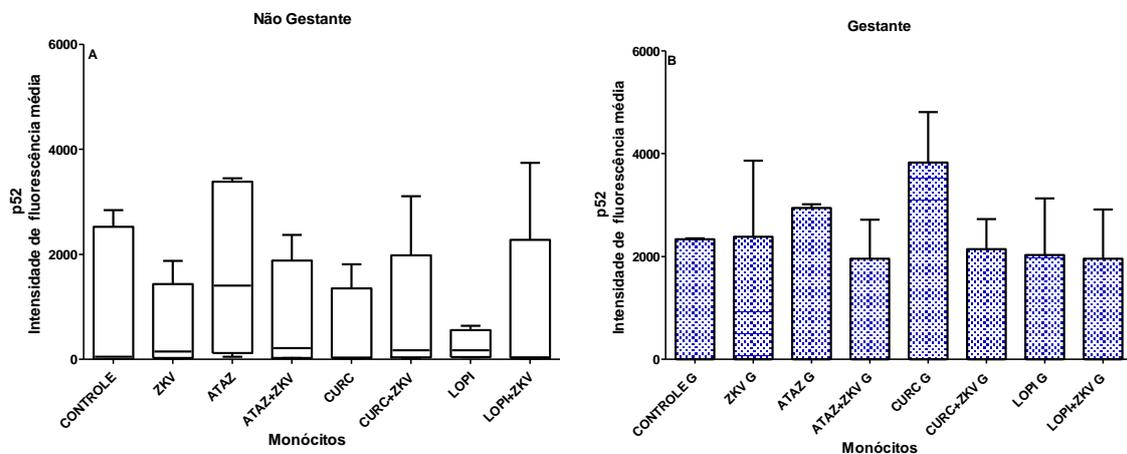


Figura 67- Efeito dos tratamentos com atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p52 nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas ou não in vitro com vírus Zika, expresso pela Intensidade de Fluorescência Média, avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- p52 NG, $p= 0,7489^1$; B- p52 G, $p= 0,9998^2$. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

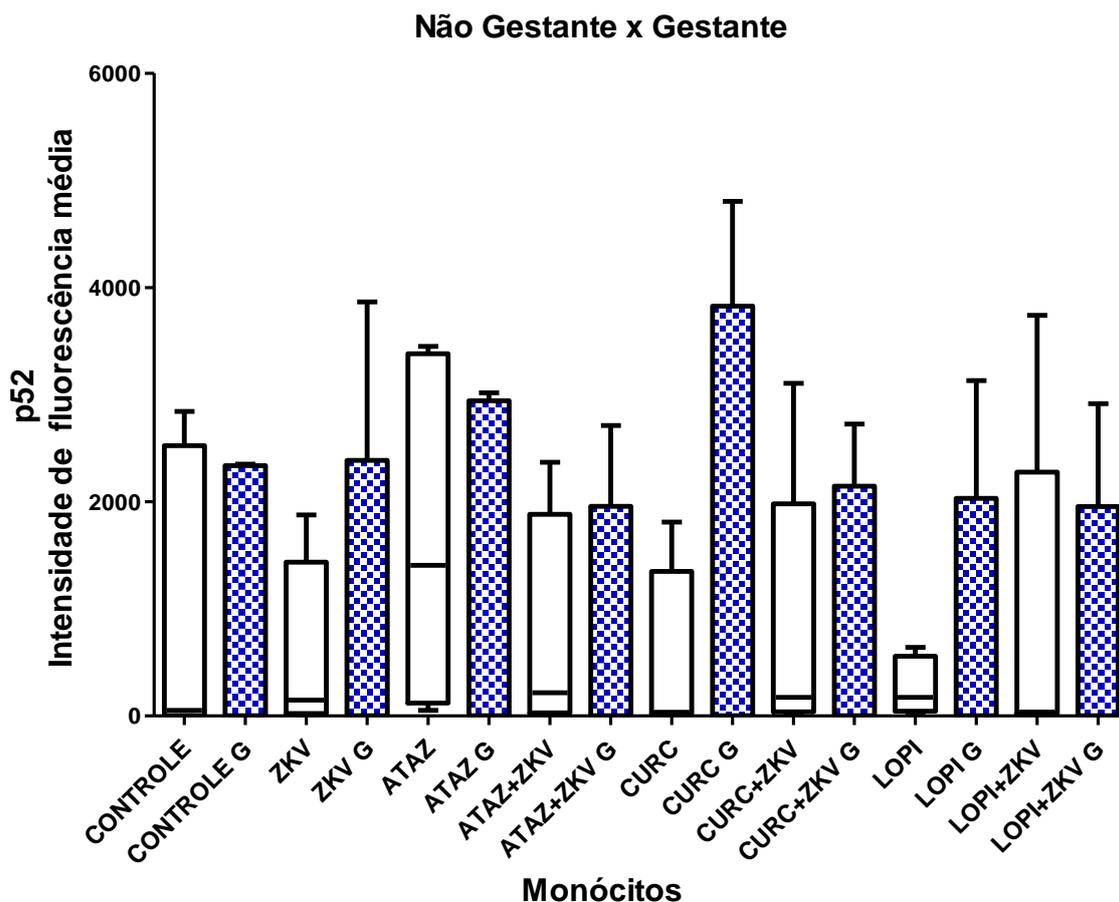


Figura 68- Avaliação comparativa do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na expressão da molécula p52 nos monócitos do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) versus gestantes (G), incubadas ou não in vitro com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. p= 0,9210². Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.5.6 Comparação entre as 5 moléculas finais das vias do NFκB

A figura 69 mostra a comparação entre as 5 moléculas finais da via do NF-κB em cada grupo de estudo.

No grupo controle o c-Rel teve maior expressão nos neuroblastomas do que todas as outras moléculas (Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, p= 0,0198). (Figura 69). No grupo incubado com o vírus Zika, o c-Rel mostrou a maior expressão que todos e o relB teve a menor expressão de todas as moléculas nos neuroblastomas (Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, p= 0,018).

No grupo tratado com o atazanavir (Figura 69C), o c-Rel teve a maior expressão que todos os outros e o p52 teve maior expressão do que o p50, relA e relB (Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn, p= 0,019). Como mostrado na figura 42D, no grupo ATAZ+ZKV, o cRel teve maior expressão do que o controle, rel B e relA (Kruskal-

Wallis, seguido pelo método de Dunn, $p < 0,014$), mas não foi diferente do p52, que também foi mais elevado do que o relA, relB e p50.

No grupo tratado com a curcumina (Figura 69 E), o c-Rel e p52 foram superiores às moléculas p50 e relB e a molécula relA foi superior a p50 (ANOVA, seguido pelo método de Tukey, $p < 0,0001$). Já no grupo CURC+ZKV (Figura 69 F), cRel foi mais elevada do que relB e p50, enquanto o relB foi menor também do que o relA e o p52 (ANOVA, seguido pelo método de Tukey, $p < 0,0001$).

No grupo lopinavir (Figura 69 G), apenas o C-rel estava aumentado em relação a relB (ANOVA, seguido pelo método de Tukey, $p = 0,0349$). Já no grupo LOPI+ZKV (Figura 69 H), onde além do tratamento com a droga, as células também foram incubadas com vírus, o C-rel estava superior a todas as outras moléculas relA, relB, p50 e p52; o p52 estava mais elevado que relB e RelA; e p50 mais elevado do que o relA (ANOVA, seguido pelo método de Tukey, $p < 0,0001$).

A figura 70 mostra a expressão das 5 moléculas finais comparadas entre não gestantes e gestantes (G), separadas por grupo de estudo.

No grupo controle (figura 70A) não houve diferença estatística entre a expressão das moléculas, nem nas não gestantes, como gestante, embora tenha havido uma maior distribuição dos dados para as moléculas relA, p50 e p52 tanto nas mulheres não gestantes, como nas gestantes.

Para as células incubadas com o vírus ZIKA (figura 70B), houve maior expressão do rel A do que do rel B e c-Rel nas mulheres controles não gestantes, enquanto que para as gestantes, e o rel A foi mais expresso do que o c-Rel. Nos grupos tratados com o atazanavir (figura 70C), tanto nas controles não gestantes quanto nas gestantes houve maior expressão do relA do que do relB e cRel, e para as controles não gestantes, o p52 mostrou maior expressão do que o relB e cRel (Figura 70C). Quando as células foram incubadas com o vírus Zika e tratadas com o atazanavir, tanto para as não gestantes como para as gestantes, observou-se maior expressão do relA do que do relB e cRel (Figura 70D).

No grupo tratado com a curcumina (figura 70E), houve maior expressão do rel A do que do rel B e c-Rel para as não gestantes e para as gestantes. Quando analisamos o grupo incubado com o vírus Zika e tratado com a curcumina (grupo CURC+ZKV), para as não gestantes, houve maior expressão do relA do que do relB, enquanto nas gestantes, o relA foi mais expresso do que o rel B e c-Rel (figura 70F).

Os grupos lopinavir (Figura 75G) e LOPI+ZKV (Figura 70H) também mostraram maior expressão de relA, mas apenas para as gestantes, onde essa molécula foi estatisticamente mais expressa do que o rel B e ao c-Rel.

No gráfico demonstrativo de não gestantes e gestantes, com todas as moléculas, em todos os grupos de estudo (figura 71), pode-se observar a maior expressão do relA, p50 e p52 em todos os grupos, embora os grupos das mulheres gestantes apresentem uma variabilidade de distribuição maior do que nas não gestantes.

Em conclusão, a expressão das moléculas c-Rel, relA, relB e p52 nas células de neuroblastoma e nos monócitos do sangue periférico parece ser influenciada pela presença do vírus Zika e pelos tratamentos com as drogas atazanavir, curcumina e lopinavir.

Nos neuroblastomas incubados com o vírus Zika, houve redução da expressão da molécula relB, enquanto no tratamento com atazanavir observou-se um leve aumento da expressão de p52. Já no tratamento com curcumina, houve aumento da expressão de c-Rel, p52 e relA. Por fim, no tratamento com lopinavir, houve redução da expressão de c-Rel e destaque da molécula relA.

Nos monócitos tanto de gestantes quanto de não gestantes, a expressão das moléculas se manteve equilibrada em todas as condições avaliadas, com poucas variações.

Assim, é possível sugerir que o vírus Zika e as drogas atazanavir, curcumina e lopinavir influenciaram a expressão das moléculas do NF- κ B, especialmente nas células de neuroblastoma.

No anexo 5 encontram-se imagens representativas do histograma de avaliação das moléculas p50, p52, p65 relA e relB em neuroblastoma.

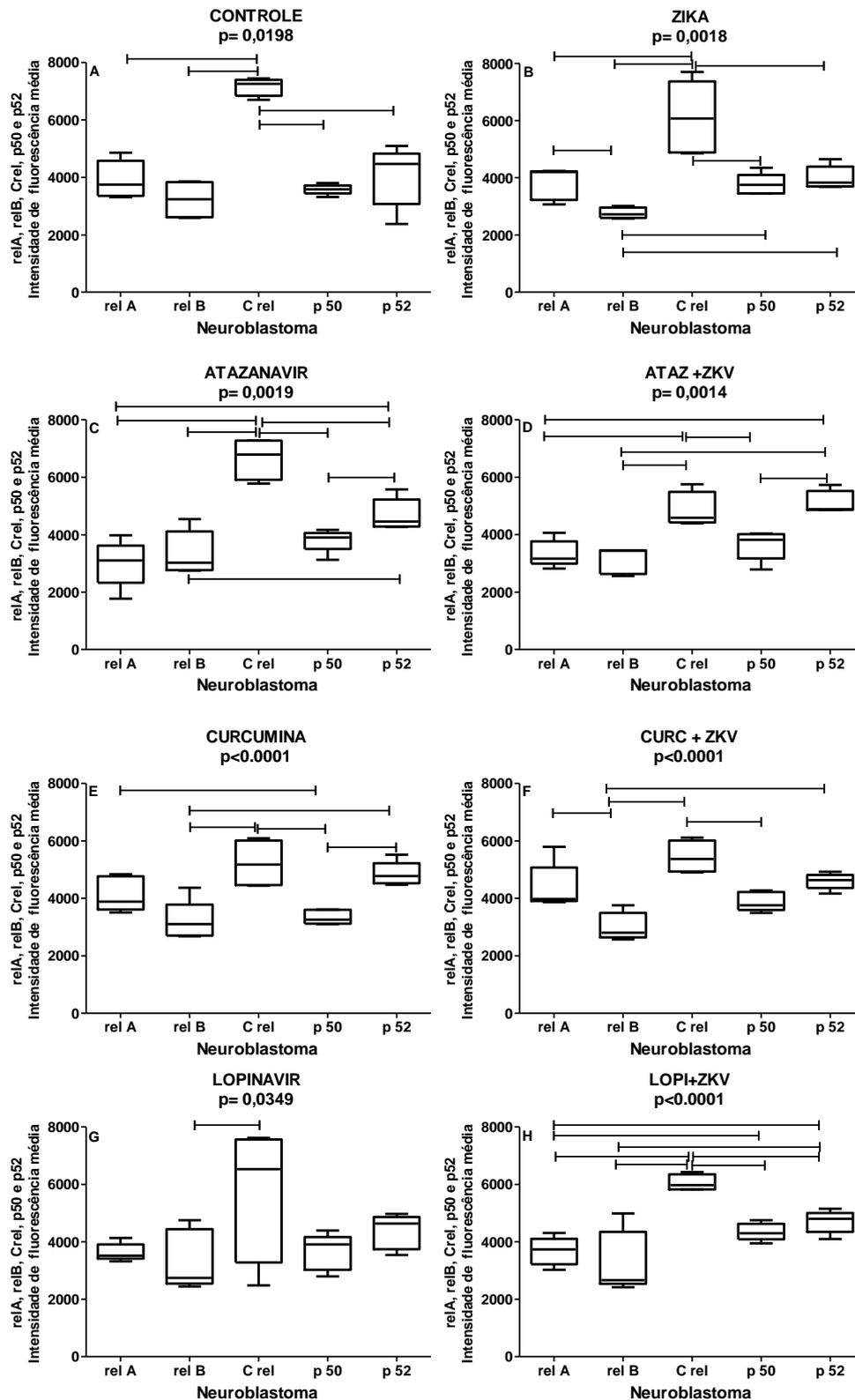


Figura 69- Comparação a expressão de relA, relB, c-Rel, p50 e p52, expressas pela Intensidade de Fluorescência Média, entre os grupos estudados, nos neuroblastomas incubados ou não com o Vírus Zika. n = 5 por grupo. As diferenças estão representadas pelas barras. Controle, p=0,0198²; ZKV, p=0,0018²; ATAZ, p=0,0019²; ATAZ+ZKV, p=0,0014²; CURCUMINA, p<0,0001¹; CURC+ZKV, p<0,0001¹; LOPINAVIR, p=0,0349¹; e LOPI+ZKV, p<0,0001¹. Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos.

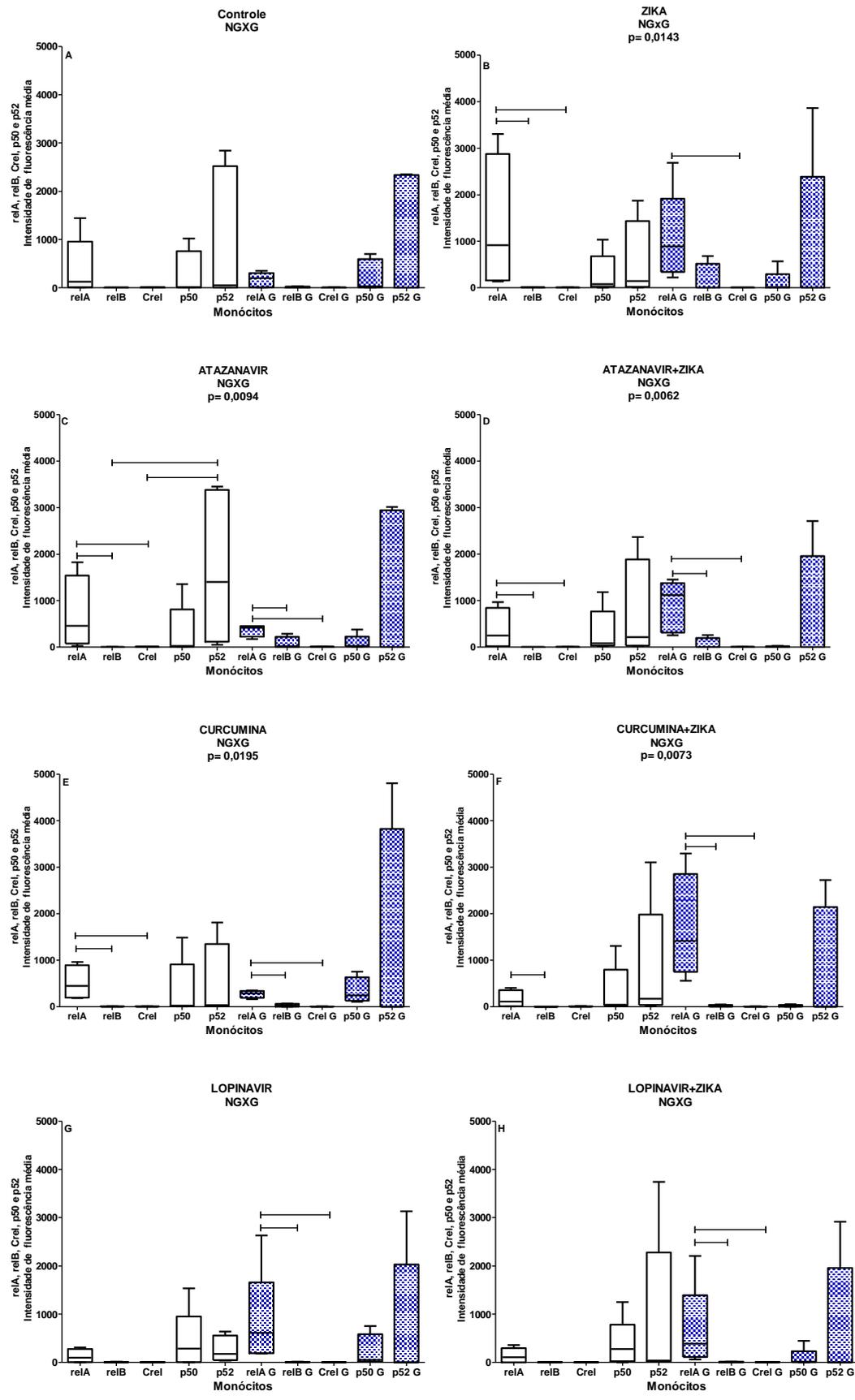


Figura 70- Comparação da expressão das moléculas rel A, rel B, c-Rel, p50 e p52 entre as não gestantes e gestantes em cada grupo de estudo, avaliados por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. A- Controle, p = 0,6933²; B- Zika, p = 0,0143²; C- Atazanavir, p = 0,0094²; D- Atazanavir+Zika, p = 0,0062²; E- Curcumina, p = 0,0195²; F- Curcumina+Zika, p = 0,0073²; G- Lopinavir, p =

0,0534²; H- Lopinavir+Zika, p= 0,0983². Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

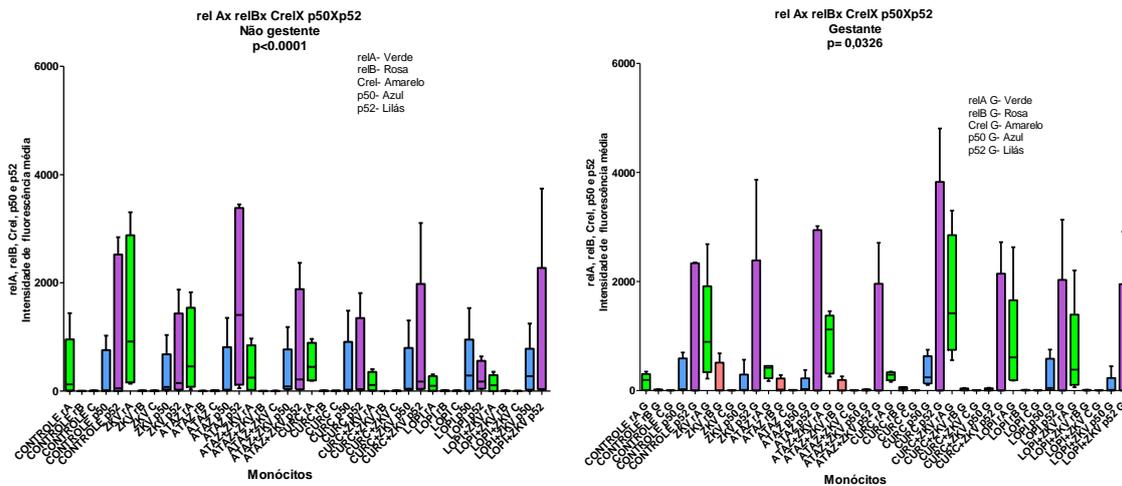


Figura 71- Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir, na expressão das moléculas rel A, rel B, c-Rel, p50 e p52 noa monócitos do sangue periférico incubadas ou não com vírus Zika, das não gestantes e das gestantes, expressa pela Intensidade de Fluorescência Média avaliado por citometria de fluxo. n = 5 por grupo. p <0.0001². Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.6 Citocinas Neuroblastoma

4.6.1 Interleucina 8 (IL-8)

Efeito do tratamento com Atazanavir, Curcumina e Lopinavir na produção da IL-8 pelos neuroblastomas SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika.

A incubação dos neuroblastomas com o vírus Zika aumentou a produção da IL-8 (Figura 72). Em todos os grupos de tratamento, atazanavir, curcumina e lopinavir, (figuraXA), o grupo incubado com o vírus e tratado produziu mais IL-8 que o grupo apenas incubado com as drogas. A curcumina isoladamente diminuiu a produção da IL-8 (Figura 72B), e o grupo LOPI+ZIV diminuiu parcialmente o aumento determinado pelo vírus isoladamente (ZIV) (Figura 72C).

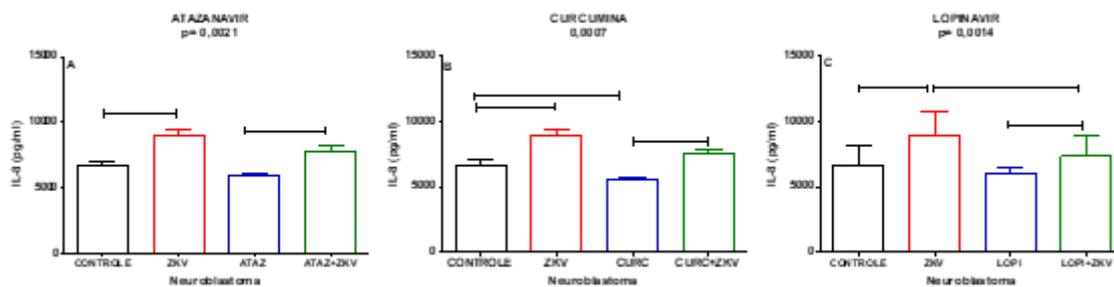


Figura 72- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-8 nos sobrenadantes de cultura de neuroblastoma SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. A- Atazanavir, $p < 0,0021^1$; B- Curcumina, $p = 0,0007^1$; C- Lopinavir, $p = 0,0014^1$. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em médias. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

4.6.2 Interleucina 12p70 (IL-12p70)

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na produção da IL-12p70 pelos neblastomas SK-N-BE (2) infectados ou não com o vírus Zika.

Apenas na situação basal, uma das culturas testadas mostrou produção discreta da IL-12p70 pelos neuroblastomas. A infecção pelo vírus e os tratamentos com as drogas não modificaram a expressão dessa citocina (figura 73).

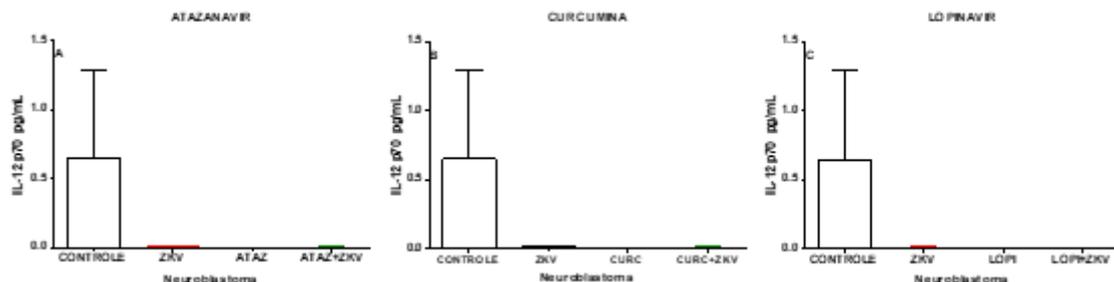


Figura 73- Efeito do tratamento com o Atazanavir, Curcumina e Lopinavir na produção de IL-12p70 nos sobrenadantes de cultura de neuroblastoma SK-N-BE (2) infectados ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. Os dados estão representados em médias. A- Atazanavir; B- Curcumina; C- Lopinavir.

4.6.3 Interleucina 6 (IL- 6)

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na produção da IL-6 pelos neblastomas SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika.

Nos grupos incubados com o vírus Zika houve aumento da produção da IL-6 pelos neuroblastomas, tanto isoladamente, como associados com o atazanavir, curcumina e lopinavir. (Figura 74 A, B e C). As três drogas utilizadas diminuiram a produção da IL-6 (Figura 7 A,B,C) e os três tratamentos diminuiram parcialmente a produção da IL-6, em relação ao aumento determinado pelo vírus Zika (Figura 74 A,B,C).

Em conclusão, a concentração de IL-6 no sobrenadante das culturas, no grupo controle foi menor do que no grupo incubado com o vírus Zika e os tratamentos com as drogas fez esses níveis baixarem ainda mais, mas quando administradas concomitantemente com o vírus, conseguiram manter a mesma produção do grupo controle (figura 74).

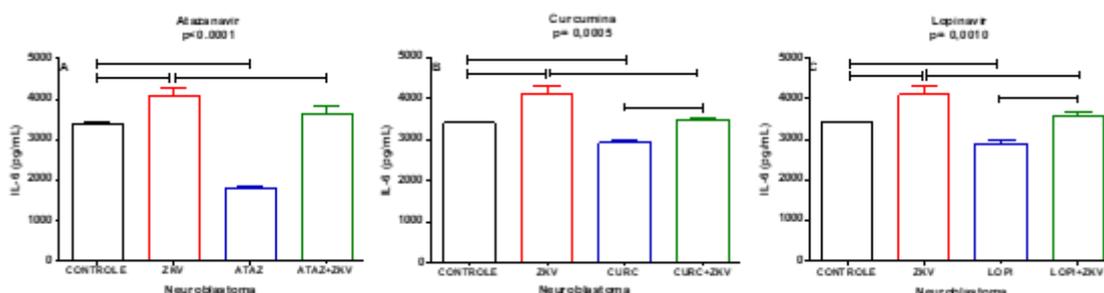


Figura 74- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-6 nos sobrenadantes de cultura de neuroblastoma SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. A- Atazanavir, p= P<0.0001¹; B- Curcumina, p= 0,0005¹; C- Lopinavir, p= 0,0010¹. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em médias. Testes: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey; ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.6.4 Interferon- γ (IFN- γ)

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na produção do IFN- γ pelos neublastomas SK-N-BE (2) infectados ou não com o vírus Zika.

Apenas na situação basal duas culturas mostraram produção IFN- γ pelos neuroblastomas. A infecção com o vírus Zika e o tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir não modificaram a produção de IFN- γ (figura 75).

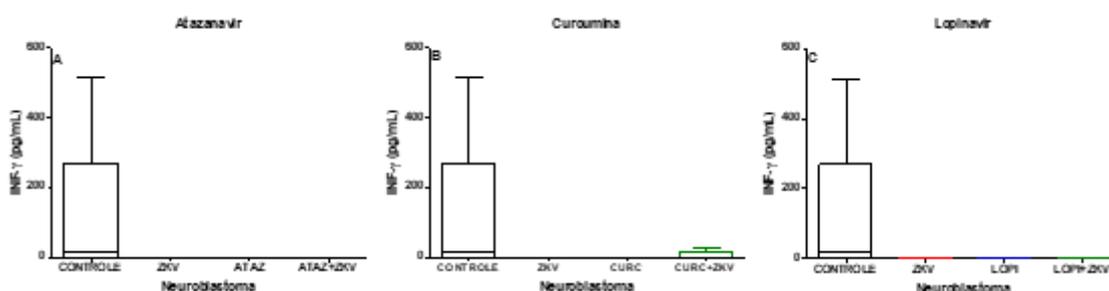


Figura 75- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de neuroblastoma SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. Os dados estão representados em médias. A- Atazanavir; B- Curcumina; C- Lopinavir.

4.6.5 Interleucina 17A (IL- 17A)

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na produção da interleucina-17A (IL-17A) pelos neuroblastomas SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika

Apenas na situação basal duas culturas mostraram produção discreta IL-17A pelos neuroblastomas. A infecção pelo vírus e os tratamentos com as drogas não modificaram a expressão dessa citocina (figura 76).

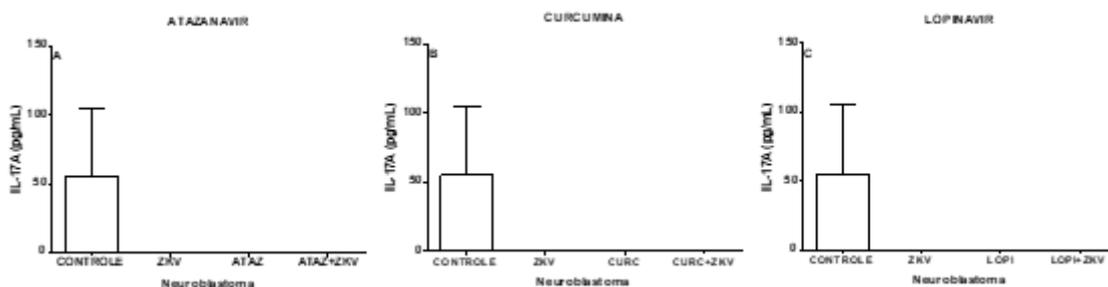


Figura 76- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-17A nos sobrenadantes de cultura de neuroblastoma SK-N-BE (2) incubados ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. Os dados estão representados em médias. A- Atazanavir; B- Curcumina; C- Lopinavir.

Em conclusão, os neuroblastomas nas condições de cultura produziram apenas a IL-8 e a IL-6 e apenas esporadicamente houve produção no grupo controle de IL-12p70, IL17A e IFN- γ . E tanto a produção da IL-8 quanto a IL-6 foram aumentadas pela incubação com o vírus e moduladas negativamente pelas três drogas estudadas.

As citocinas IL-1 β , IL-10, TNF- α , IL-2 e IL-4 não foram detectadas nos sobrenadantes das culturas dos neuroblastomas no limite de detecção dos kits utilizados.

4.7 Citocinas Mononucleares

4.7.1 Interleucina 8 (IL-8)

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na produção da IL-8 pelas células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes e gestantes incubadas in vitro ou não com o vírus Zika

A IL-8 apresentou altos níveis de concentração no sobrenadante das culturas de células mononucleares, assemelhando-se aos níveis observados dos neuroblastomas.

A infecção pelo vírus Zika aumentou a produção da IL-8 em mulheres gestantes ou não gestantes (figura 77). Entretanto, os valores foram ainda mais elevados nas mulheres gestantes do que nas não gestantes (figura 77). Nenhum dos tratamentos isoladamente (atazanavir, curcumina e lopinavir) modificou a produção da IL-8 em relação ao grupo controle basal, nem nas não gestantes nem nas gestantes (figura 77). Das células mononucleares do sangue periférico incubadas com o vírus e tratadas com as drogas das mulheres não gestantes, somente no grupo ATAZ+ZIV a concentração da IL-8 permaneceu maior do que o grupo controle basal e ATAZ, e semelhante ao grupo Zika (figura 77C); para as outras duas drogas (curcumina e lopinavir) os grupos curc+ZIV e lopi+ZIV não foram estatisticamente diferentes do grupo controle basal (Figura 77A e E).

Para as mulheres gestantes, em todos os tratamentos nos grupos incubados concomitantemente com as drogas e o vírus Zika, o tratamento não modificou o aumento induzido pelo vírus (Figura 77B, D, F).

Na comparação entre as não gestantes e gestantes para cada tratamento, os níveis da IL-8 foram superiores às das não gestantes para os grupos controle *versus* controle G; ZKV *versus* ZKVG, ATAZ+ZKV *versus* ATAZ+ZKV G, CURC x CURC G, CURC+ZKV x CURC+ZKV G, LOPI+ZKV x LOPI+ZKV G (figura 78).

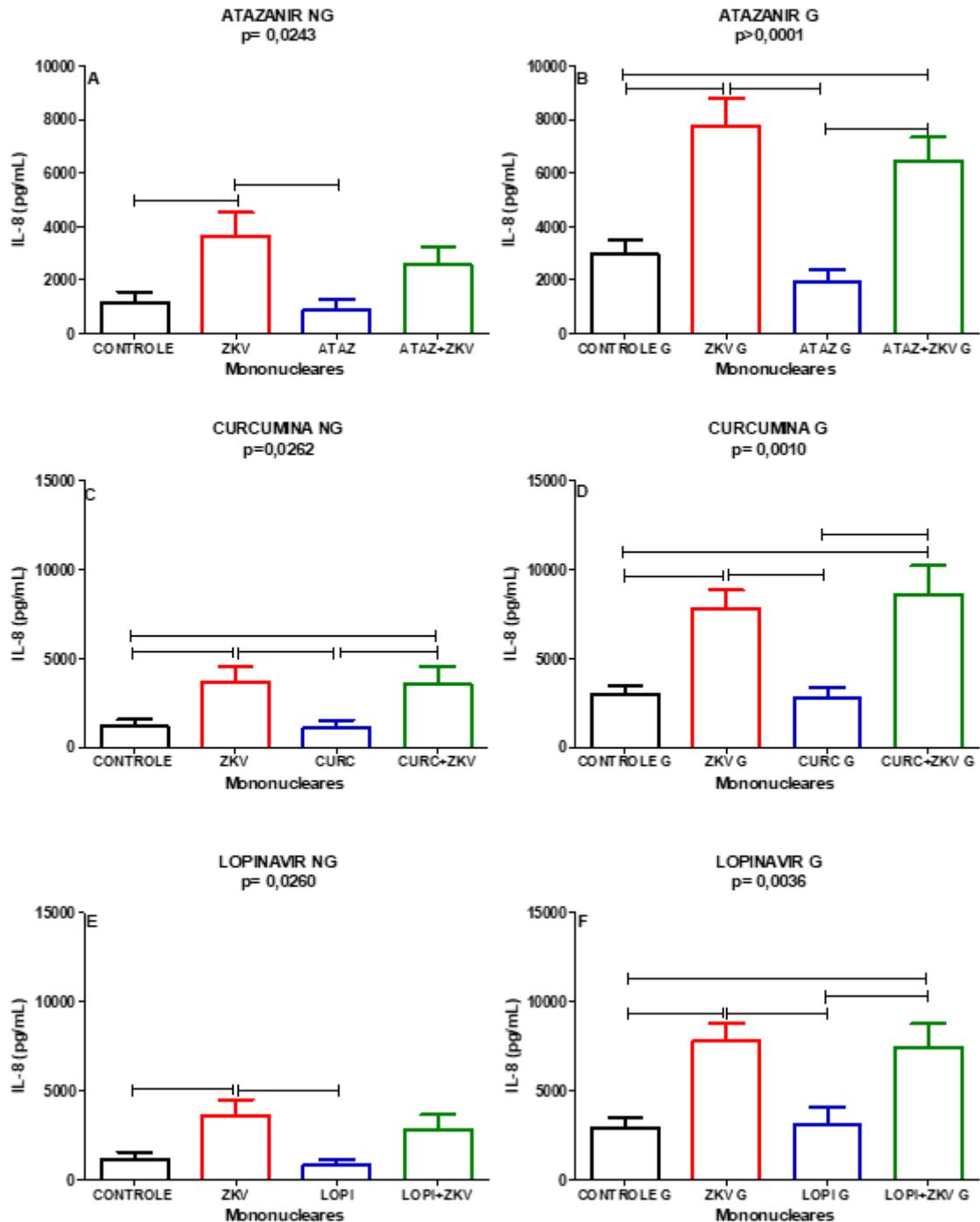


Figura 77- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-8 nos sobrenadantes das cultura das células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em médias. A- atazanavir NG, p = 0,0243¹; B- atazanavir G, p = 0,0001¹; C- curcumina NG, p = 0,0262¹; D- curcumina G, p= 0,0010¹; E- lopinavir NG, p= 0,0260¹; F- lopinavir G, p= 0,0036¹. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

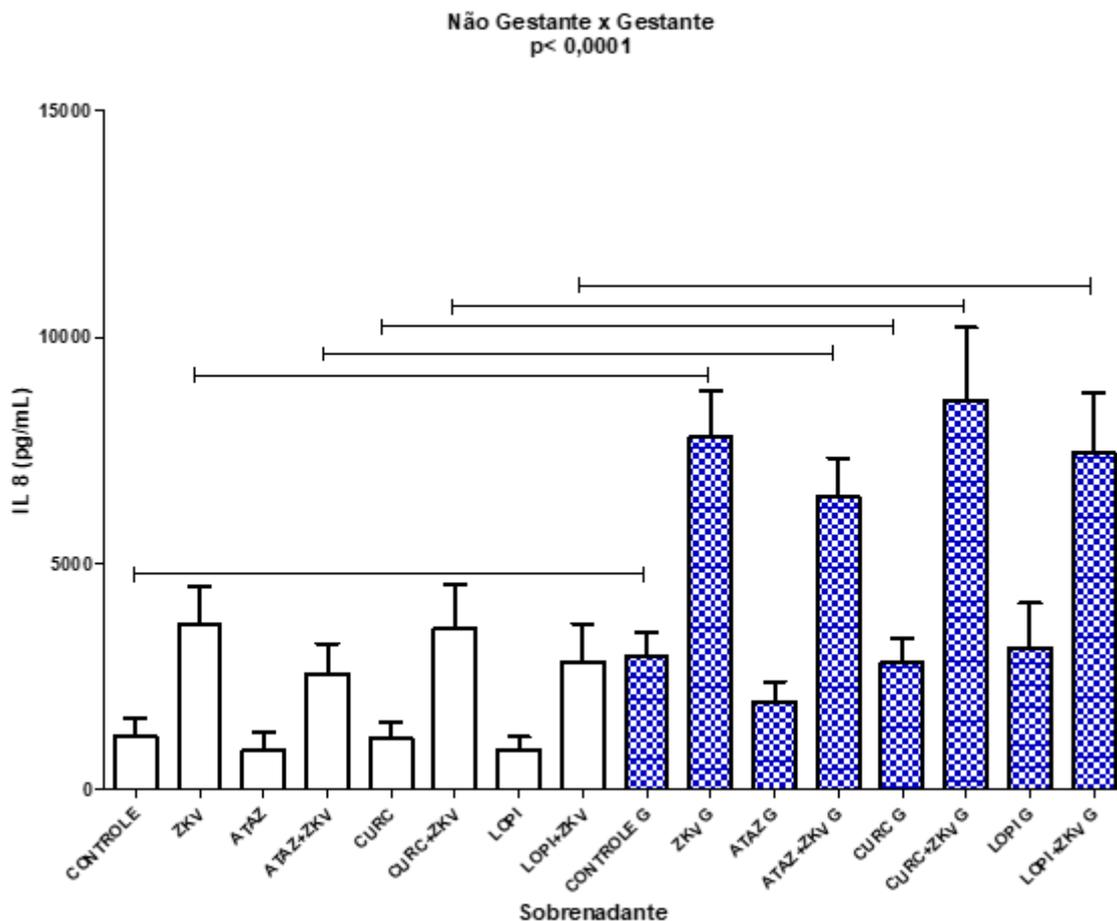


Figura 78- Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-8 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. p < 0,0001². As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em médias. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.7.2 Interleucina 1β (IL-1β)

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na produção da IL-1β pelas células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes e gestantes incubadas in vitro ou não com o vírus Zika.

Na avaliação das não gestantes (NG), apenas o grupo CURC+ZIV mostrou maior produção da IL-1β estatisticamente maior que o grupo controle basal. (figura 79 A, C e E).

Na avaliação da IL-1 β nas gestantes (G), o vírus Zika aumentou a produção da IL-1 β e nos grupos incubados com o vírus e o atazanavir e a curcumina, o aumento da produção da IL-1 β foi ainda maior do que a dos outros grupos (Figura 80).

Na comparação entre as não gestantes *versus* gestantes, a produção da IL-1 β foi mais elevada nas gestantes dos grupos ATAZ+ZKV x ATAZ+ZKV G, CURC+ZKV x CURC+ZKV G, LOPI+ZKV x LOPI+ZKV G (figura 80).

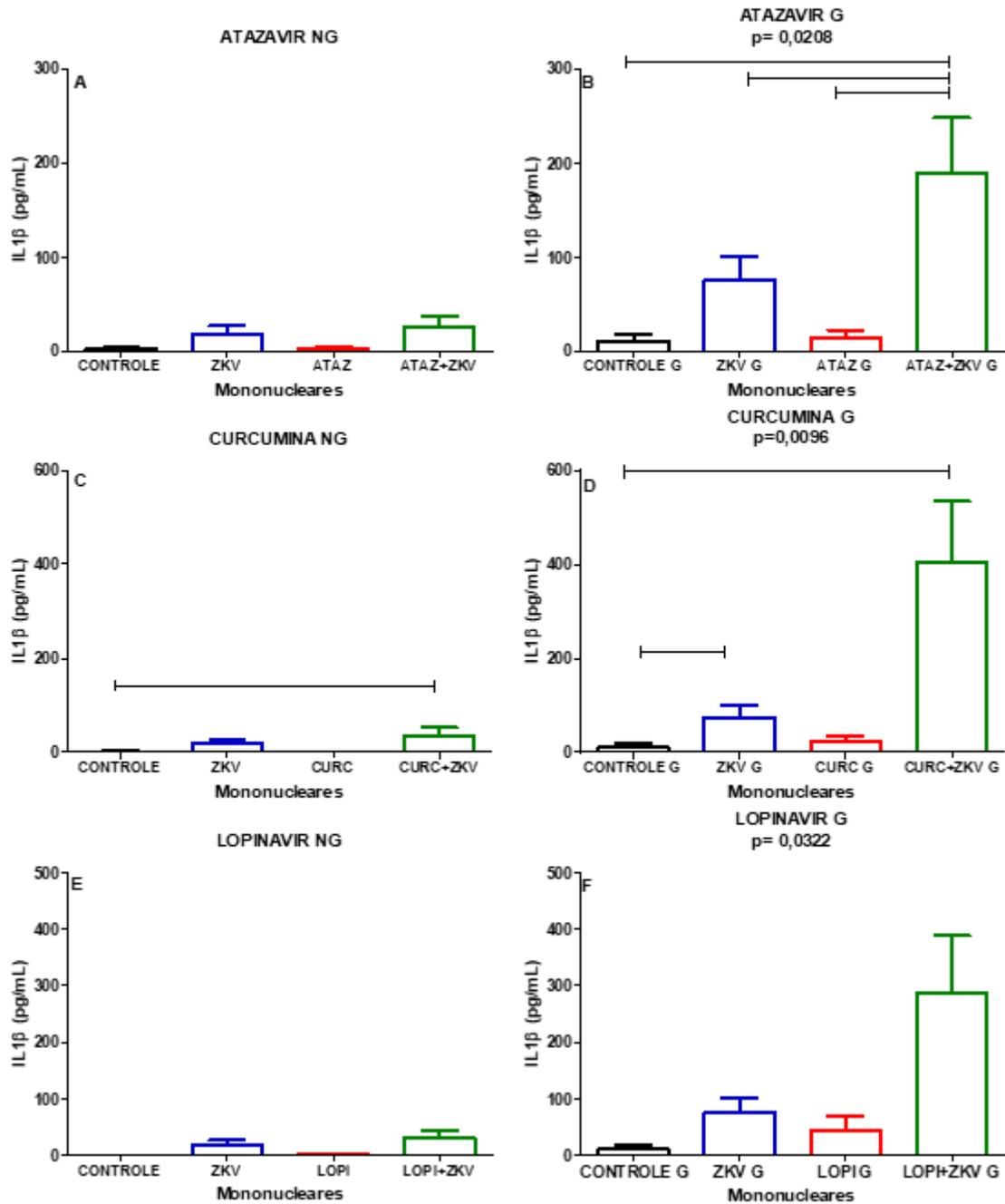


Figura 79- Efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-1 β nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas *in vitro* ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados

em médias \square EPM. A- Atazanavir NG, $p=0,1459^2$; B- Atazanavir G, $p=0,0208^1$; C- Curcumina NG, $p=0,1333^2$; D- Curcumina G, $p=0,0096^2$; E- Lopinavir NG, $p=0,1068^1$; F- Lopinavir G, $p=0,0322^2$. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

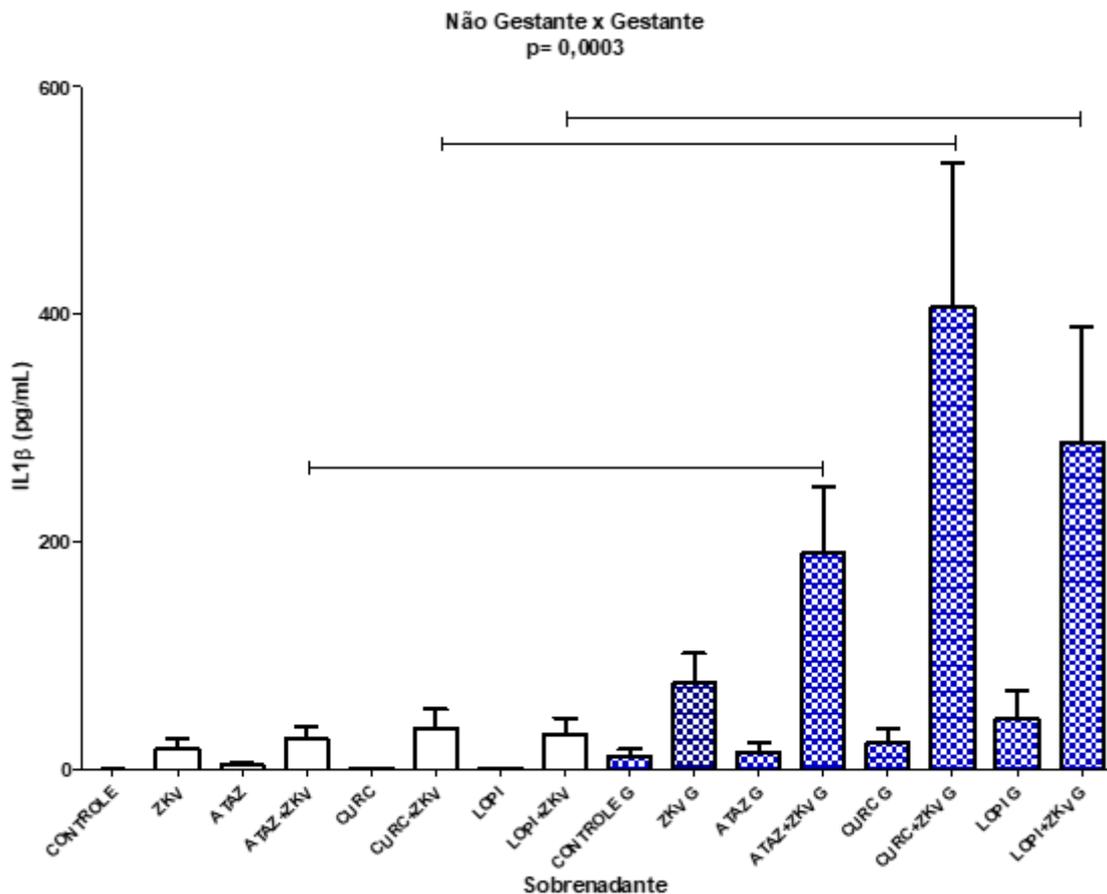


Figura 80- Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-1 β nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. $n=5$ por grupo. $p=0,0003^2$. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em médias. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.7.3 Interleucina 6 (IL-6)

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na produção da IL-6 pelas células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes e gestantes incubadas in vitro ou não com o vírus Zika

Não houve diferença estatística na produção da IL-6 nas pelas células mononucleares do sangue periférico das mulheres não gestantes (NG) entre todos os grupos de estudo, pela incubação com o vírus ou o tratamento com as drogas (figura 81 A, C e E).

Nas mulheres gestantes, a incubação com o vírus Zika aumentou a produção da IL-6 (figura 86), sendo que o tratamento com a curcumina e com o lopinavir aumentou ainda mais os níveis da IL-6 (figura 81 D, F).

Quando comparamos as mulheres não gestantes versus gestantes, os níveis de IL-6 foram superiores nas gestantes em relação às não gestantes nas comparações entre os grupos ZKV *versus* ZKV G, ATAZ *versus* ATAZ G, ATAZ+ZKV *versus* ATAZ+ZKV G, CURC+ZKV *versus* CURC+ZKV G, LOPI *versus* LOPI G, LOPI+ZKV *versus* LOPI+ZKV G (figura 82).

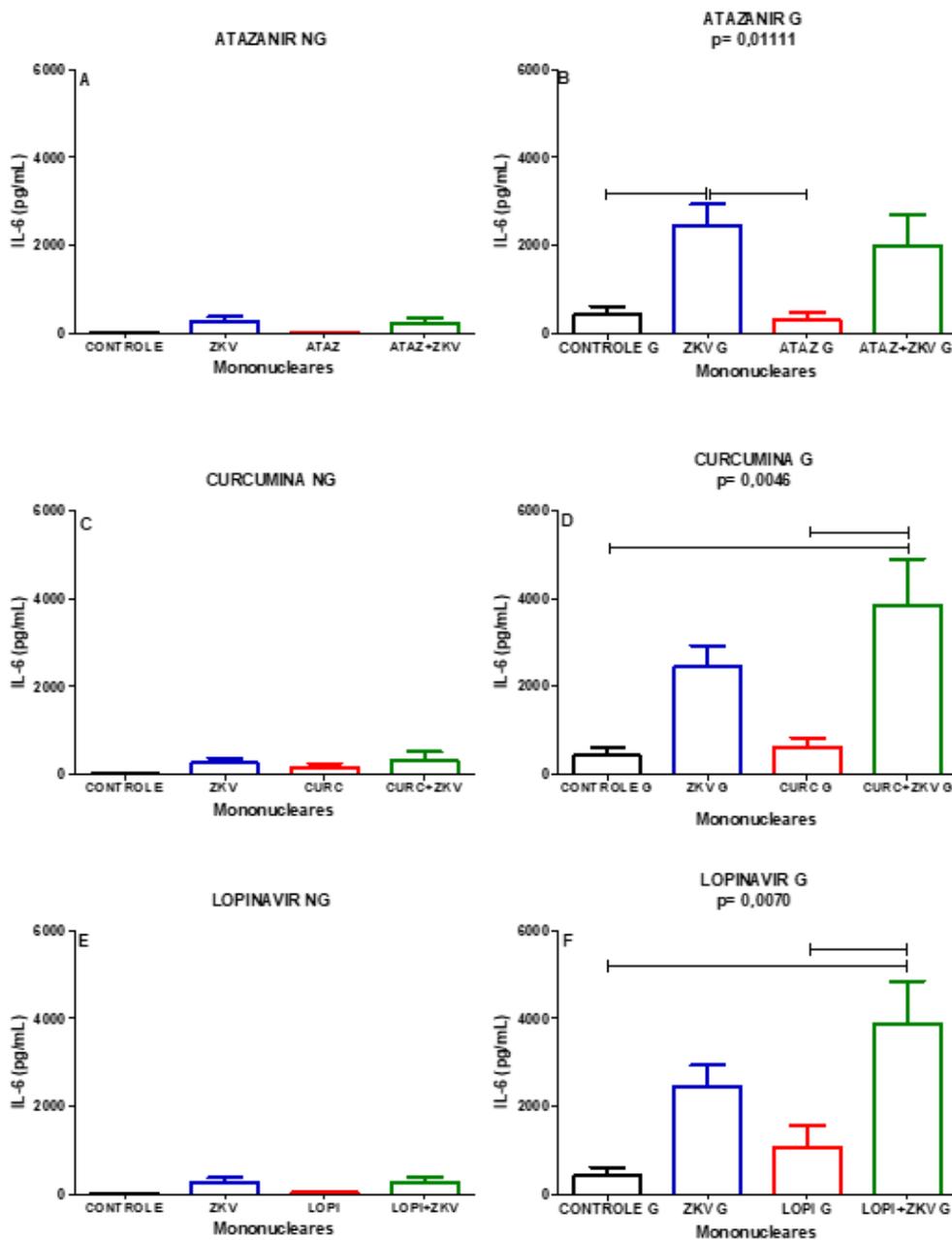


Figura 81- Avaliação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-6 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de mulheres não

gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em médias. A- Atazanavir NG, p= 0,0595¹; B- Atazanavir G, p= 0,01111¹; C- Curcumina NG, p= 0,4208¹; D- Curcumina G, p= 0,0046¹; E- Lopinavir NG, p= 0,0585¹; F- Lopinavir G, p= 0,0070¹. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

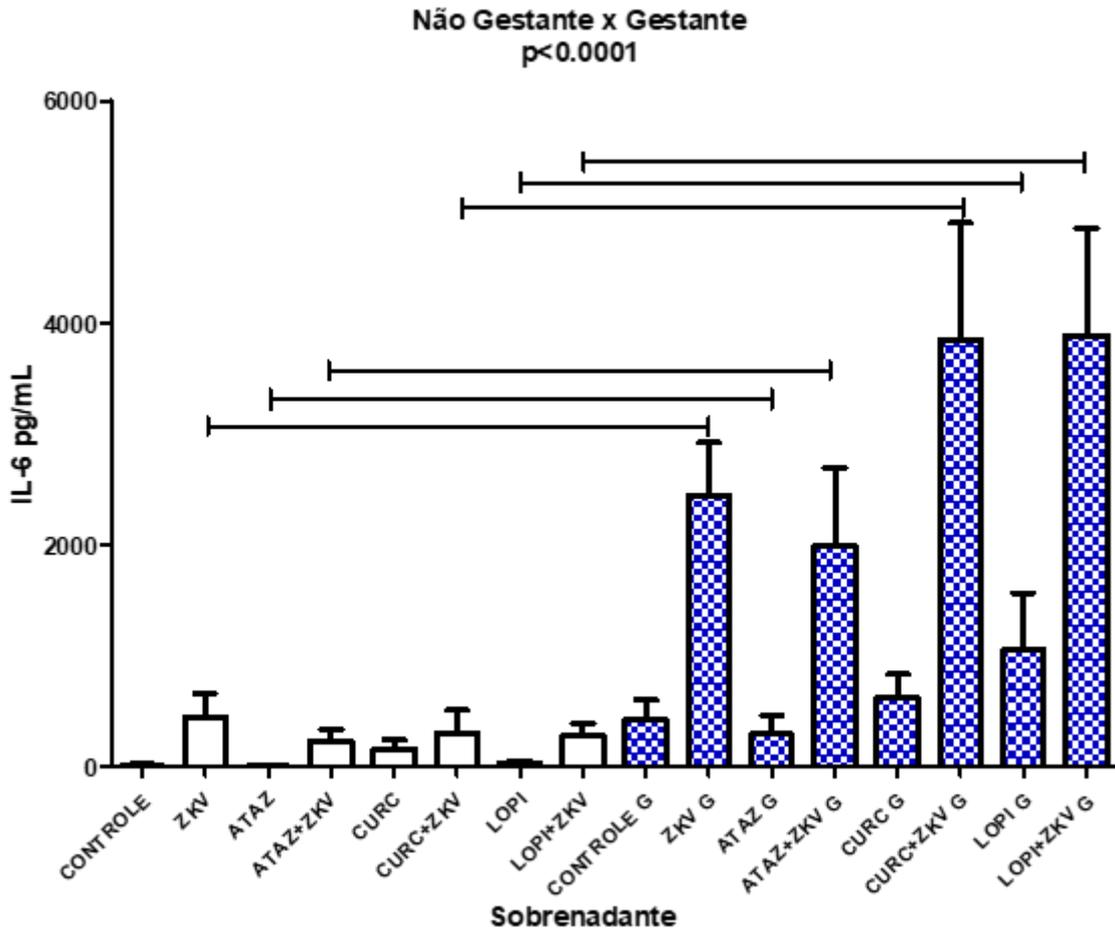


Figura 82- Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de IL-6 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. p < 0,0001¹. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em médias □ EPM. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

4.7.4 Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na produção do TNF- α pelas células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes e gestantes incubadas in vitro ou não com o vírus Zika.

A incubação com o vírus Zika aumentou a produção do TNF- α em mulheres não gestantes e gestantes (Figura 83), sendo que nas mulheres gestantes o aumento da concentração do TNF- α foi muito maior do que nas não gestantes (Figura 84). Nos grupos incubados com o vírus e com as três drogas houve menor produção do TNF- α (Figura 83 B,D,F), aproximando-se dos valores da produção do TNF- α pelas células mononucleares das mulheres gestantes controles normais não incubadas com o vírus.

Na comparação entre não gestantes e gestantes a concentração do TNF- α foi mais elevada nas gestantes entre os grupos ZKV *versus* ZKV G, ATAZ+ZKV *versus* ATAZ+ZKV G, CURC+ZKV *versus* CURC+ZKV G, LOPI+ZKV *versus* LOPI+ZKV G (figura 84). Embora os valores da produção do TNF- α das gestantes mostraram-se maiores do que das mulheres não gestantes, quando as células mononucleares das mulheres gestantes foram incubadas com as três drogas, as concentrações do TNF- α aproximaram-se dos valores observados nas mulheres gestantes em que as células não foram incubadas com o vírus.

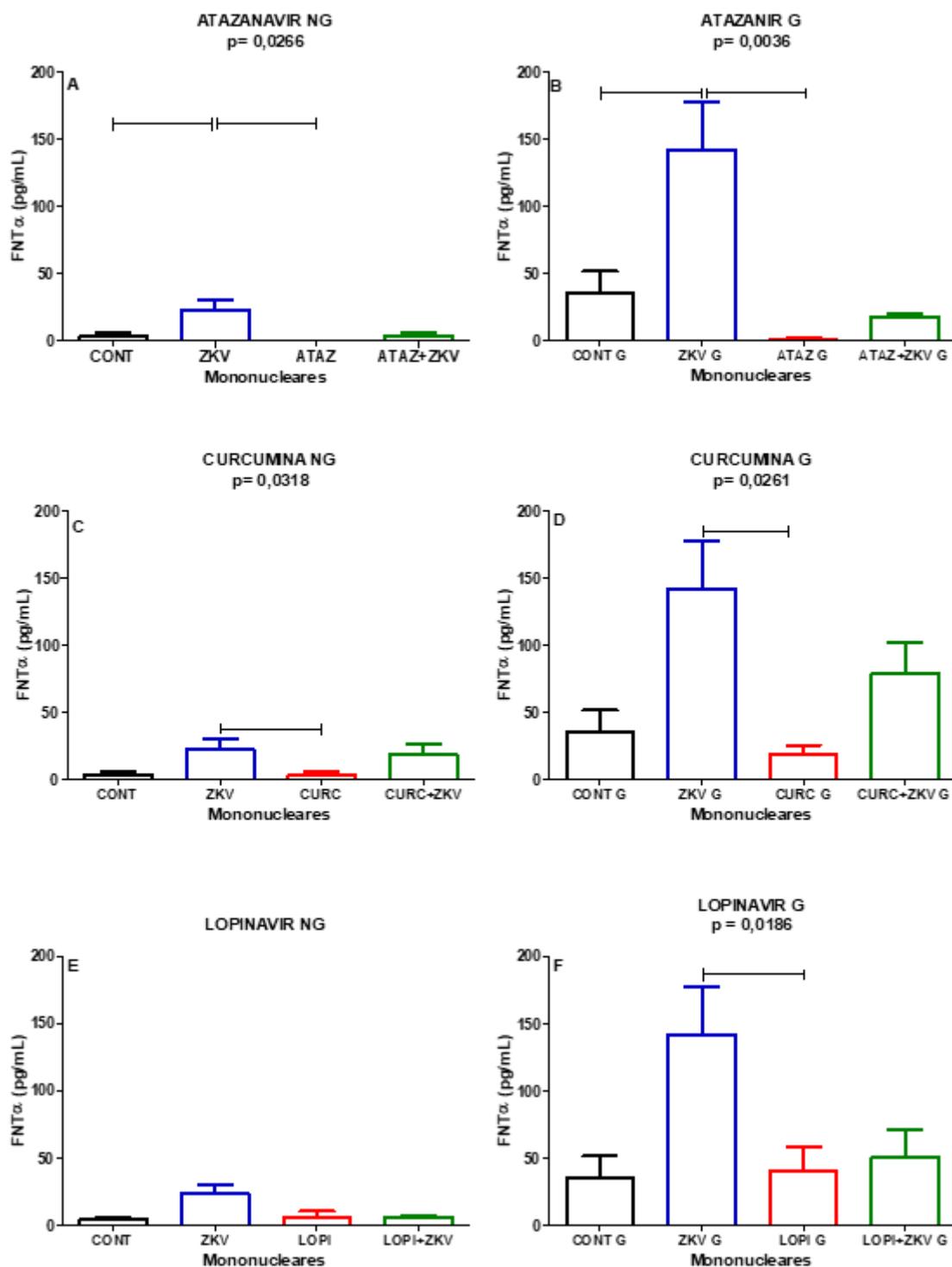


Figura 83- Avaliação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em médias \pm EPM. A- Atazanavir NG, p= 0,0266²; B- Atazanavir G, p= 0,0036²; C- Curcumina NG, p= 0,0318²; D- Curcumina G, p= 0,0261²; E- Lopinavir NG, p= 0,0634²; F- Lopinavir G, p= 0,0186¹. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey e ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn

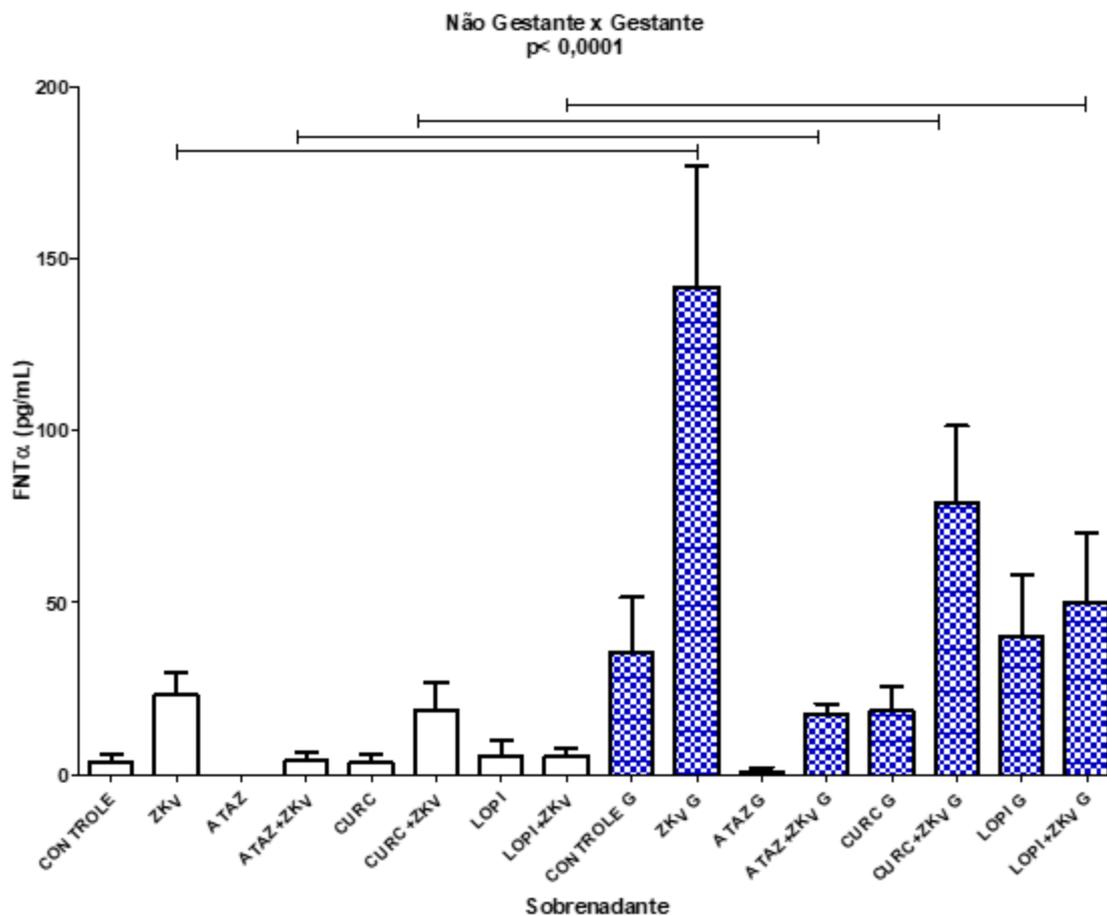


Figura 84- Comparação do efeito do tratamento com o Atazanavir, Curcumina e Lopinavir na produção de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de mulheres Não Gestantes (NG) e Gestantes (G) infectadas in vitro ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. p<0,0001². As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em médias. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.8 Quimiocinas Mononucleares

4.8.1 CCL2/MCP-1

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na produção da quimiocina MCP-1 pelas células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes e gestantes incubadas in vitro ou não com o vírus Zika.

Nas mulheres não gestantes, os grupos incubados com o vírus Zika produziram mais MCP-1 do que os grupos tratados isoladamente com o atazanavir e lopinavir (figura 85 A, E) e nas mulheres gestantes o grupo tratado com o atazanavir produziu menor quantidade da MCP-1 do que o grupo incubado somente com o vírus Zika (figura 85B)

Quando comparamos as mulheres não gestantes com as gestantes, observamos que o grupo ATZG produziu estatisticamente mais o MCP-1 do que as células mononucleares do grupo ATZ (figura 86),

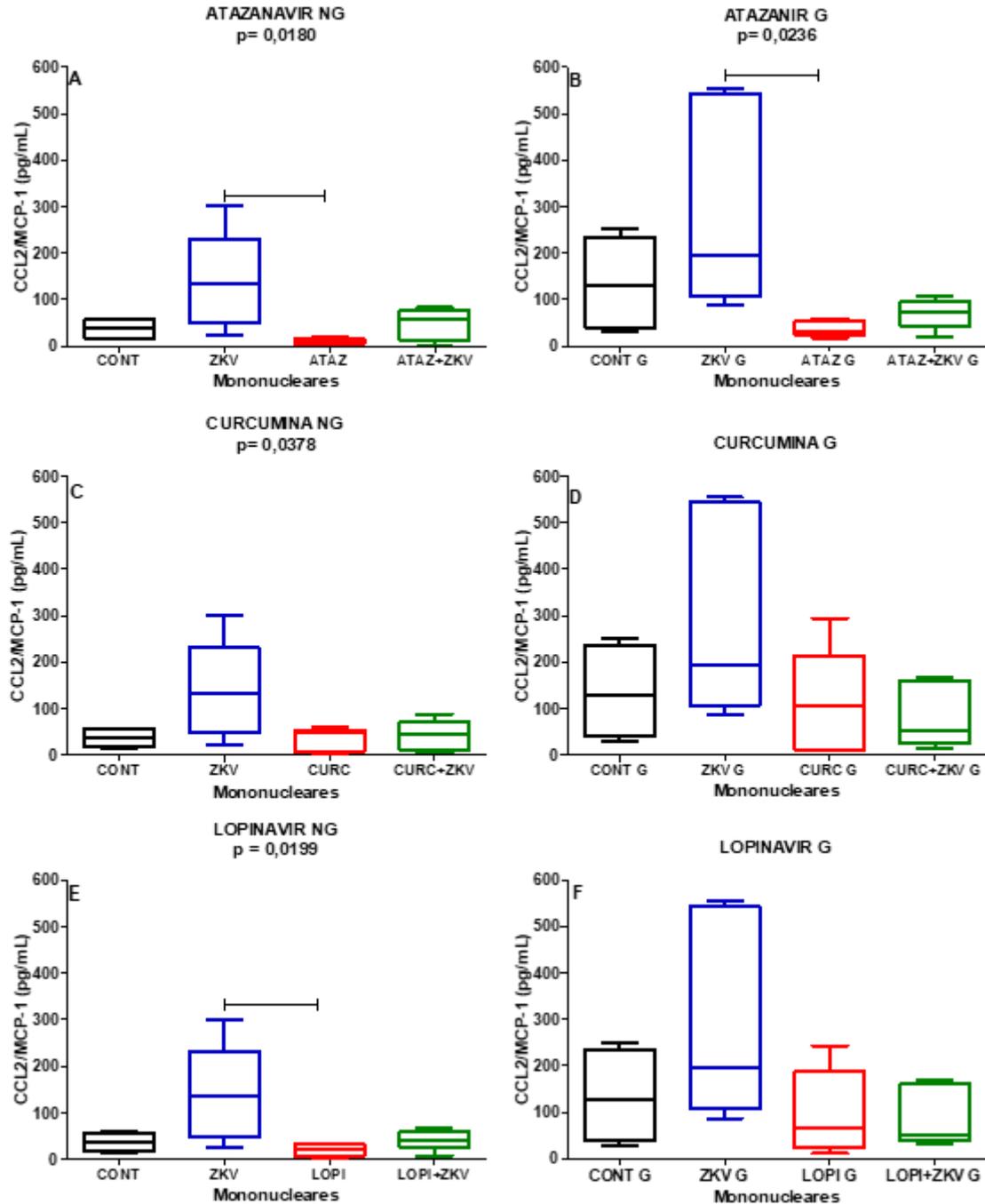


Figura 85- Avaliação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção da quimiocina MCP-1 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. A- Atazanavir NG, p= 0,0180¹; B- Atazanavir G, p= 0,0236¹; C- Curcumina NG, p= 0,0378¹; D- Curcumina G, p= 0,1227¹; E- Lopinavir NG, p= 0,0199¹; F- Lopinavir G, p= 0,1005¹. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

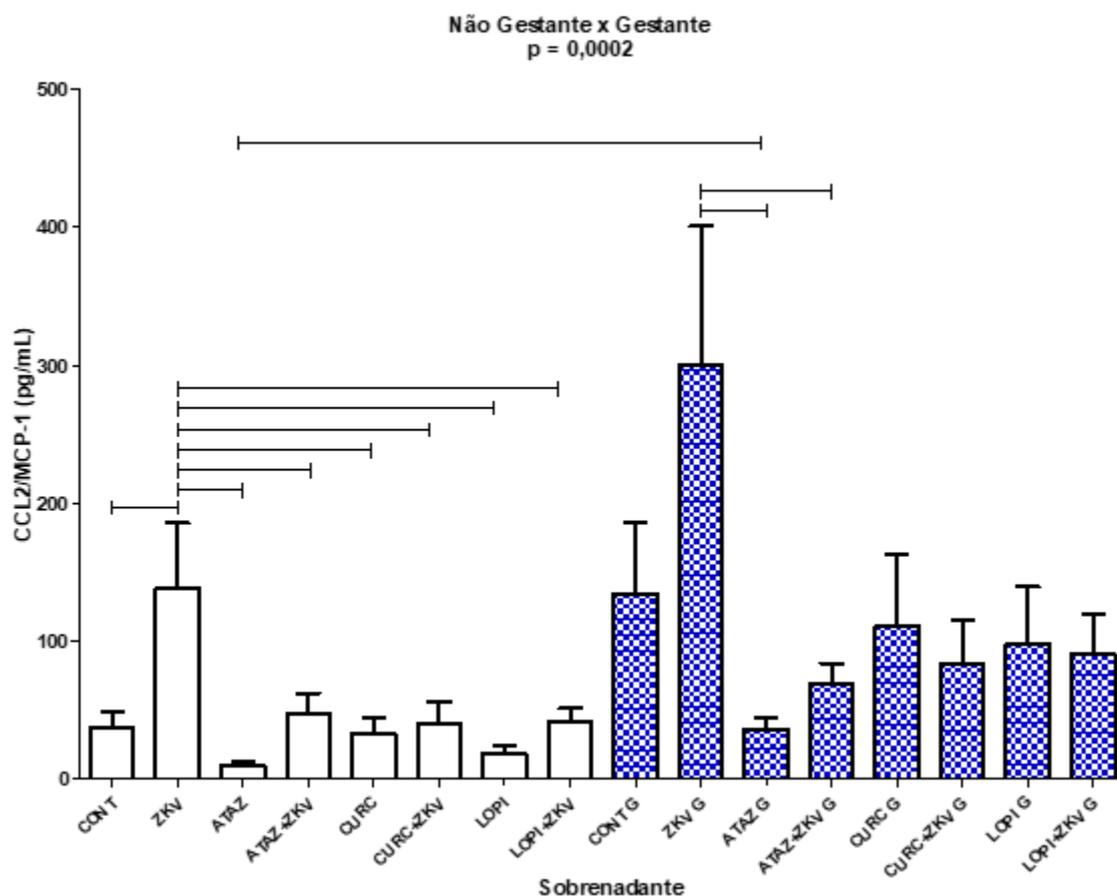


Figura 86- Comparação do efeito do tratamento com o Atazanavir, Curcumina e Lopinavir na produção de MCP-1 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. p=0,0002¹. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em médias. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

4.8.2 CCL5/RANTES

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na produção da quimiocina RANTES pelas células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes e gestantes incubadas in vitro ou não com o vírus Zika.

Nem nas mulheres não gestantes nem nas mulheres gestantes houve diferença estatística entre os grupos (figura 87). Na comparação entre as mulheres não gestantes e gestantes por cada grupo de estudo, verificamos que embora não tenha havido diferença estatística entre os grupos, a dispersão dos resultados das mulheres gestantes foi muito maior do que das não gestantes (Figura 88).

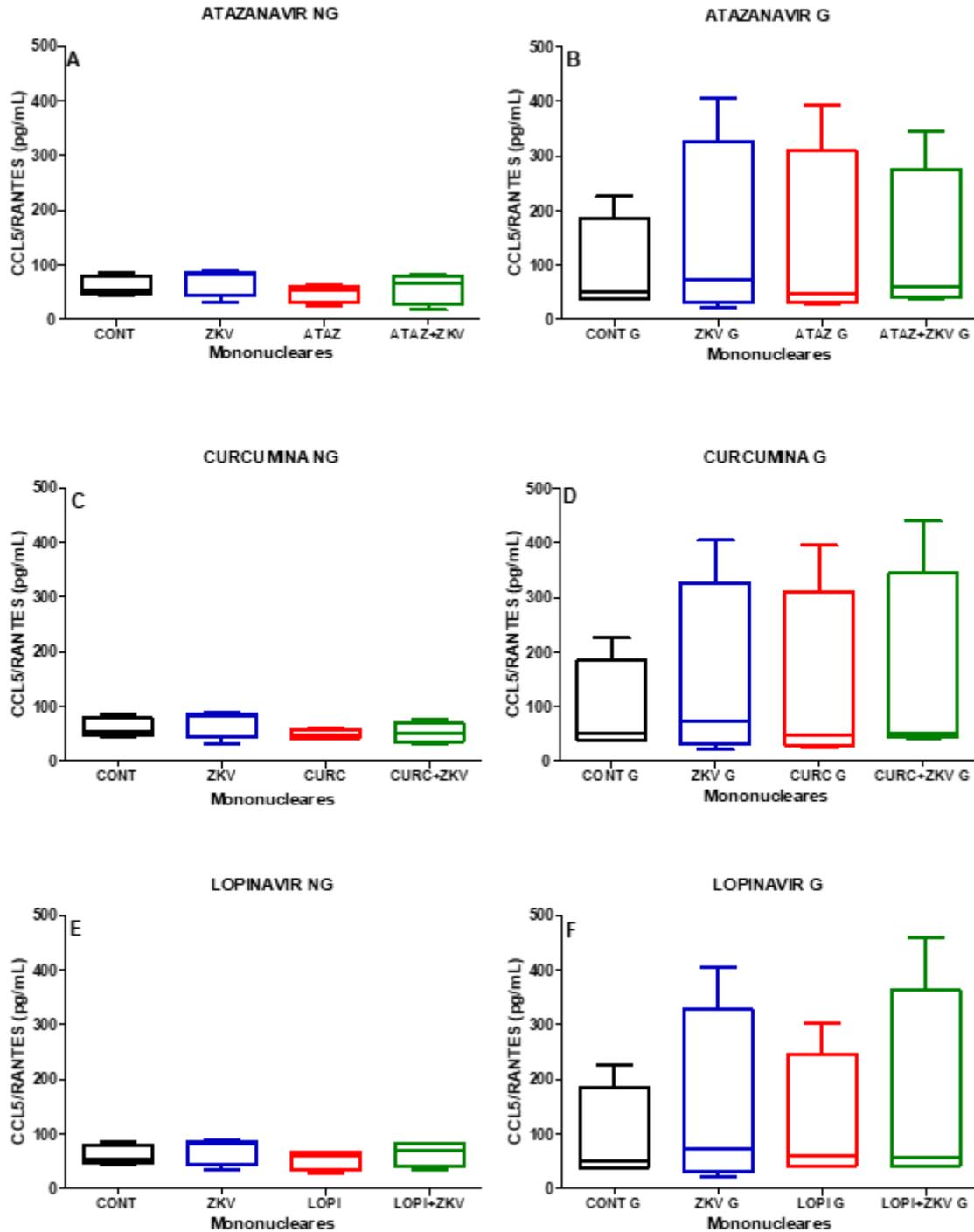


Figura 87- Avaliação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção da quimiocina RANTES nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. A- Atazanavir NG, $p = 0,4773^2$; B- Atazanavir G, $p = 0,9778^2$; C- Curcumina NG, $p = 0,4039^2$; D- Curcumina G, $p = 0,9074^1$; E- Lopinavir NG, $p = 0,5755^2$; F- Lopinavir G, $p = 0,8883^2$. Teste: 2 Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

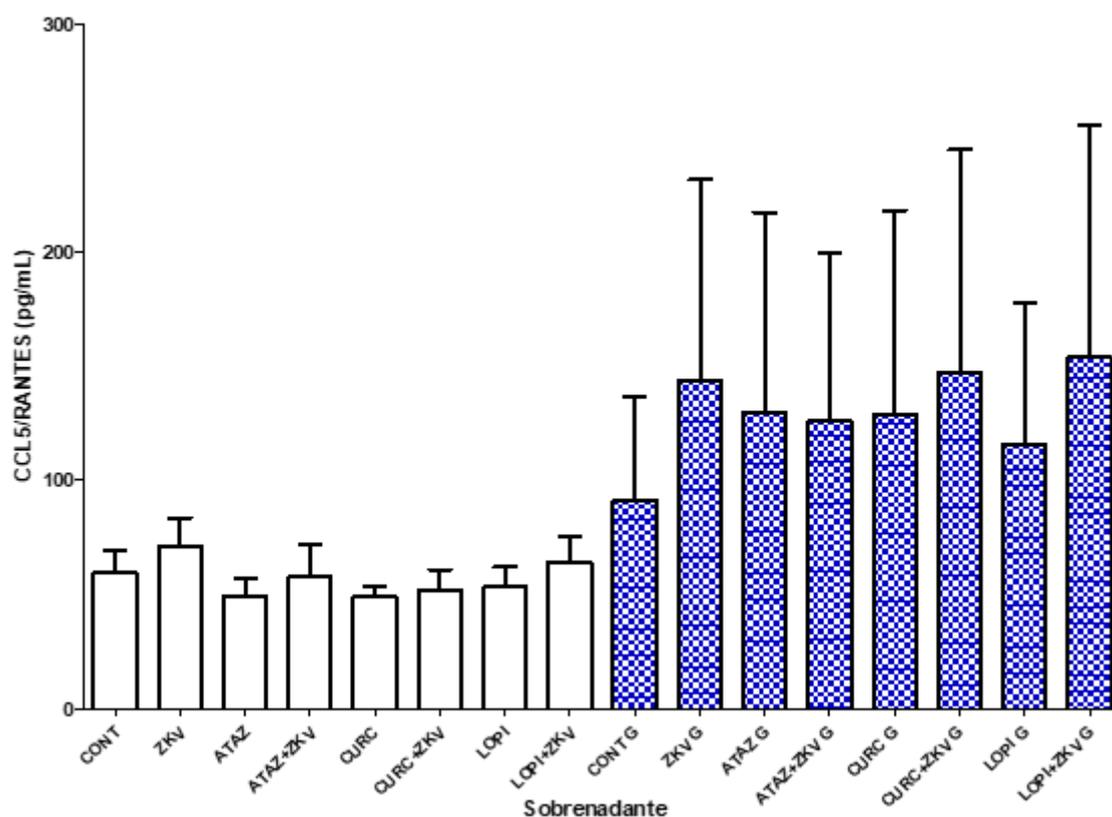


Figura 88- Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na produção de RANTES nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres não gestantes (NG) e gestantes (G) incubadas in vitro ou não com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. $p=0,9962^2$. As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em médias. Teste: 2 Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

As citocinas IL-10, IL-12p70, IL-2, IL-4, IFN- γ e IL17A não foram detectadas nos sobrenadantes das culturas das células mononucleares do sangue periférico in vitro, nas condições das culturas e no limite de detecção dos kits utilizados.

As quimiocinas MIG e IP-10 não foram detectadas no sobrenadante das culturas das células mononucleares do sangue periférico, nas condições de estudo e no limite de detecção dos kits utilizados.

4.9 Cinética de citocinas em células mononucleares

Com o objetivo de avaliar a influência das drogas atazanavir, curcumina e lopinavir na cinética da produção das citocinas IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-8 pelas células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis na presença do vírus Zika, as

citocinas foram quantificadas por 4 dias nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas após o início do tratamento com as drogas.

4.9.1 IL-6

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na cinética (24, 48, 72 e 96h) da produção da IL-6 pelas células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika.

No grupo incubado apenas com o vírus Zika, houve uma queda acentuada na produção da IL-6 observado após 48h de incubação (24 versus 48, $p=0,04$, teste t pareado), sendo a produção irregular após esse período (figura 89 A). Para os grupos tratados com o atazanavir e curcumina, foi observado uma queda estatisticamente significativa entre 48 e 72 h com retorno aos valores de 24 h quando avaliado após 96 h (figura 89 B, C). Para o tratamento com o lopinavir, as concentrações mostraram-se mais irregulares (figura 89 D e 95). Na figura 90 pode ser verificado a cinética da produção de IL-6 até 96 horas pós tratamento apresentada em gráfico de barras.

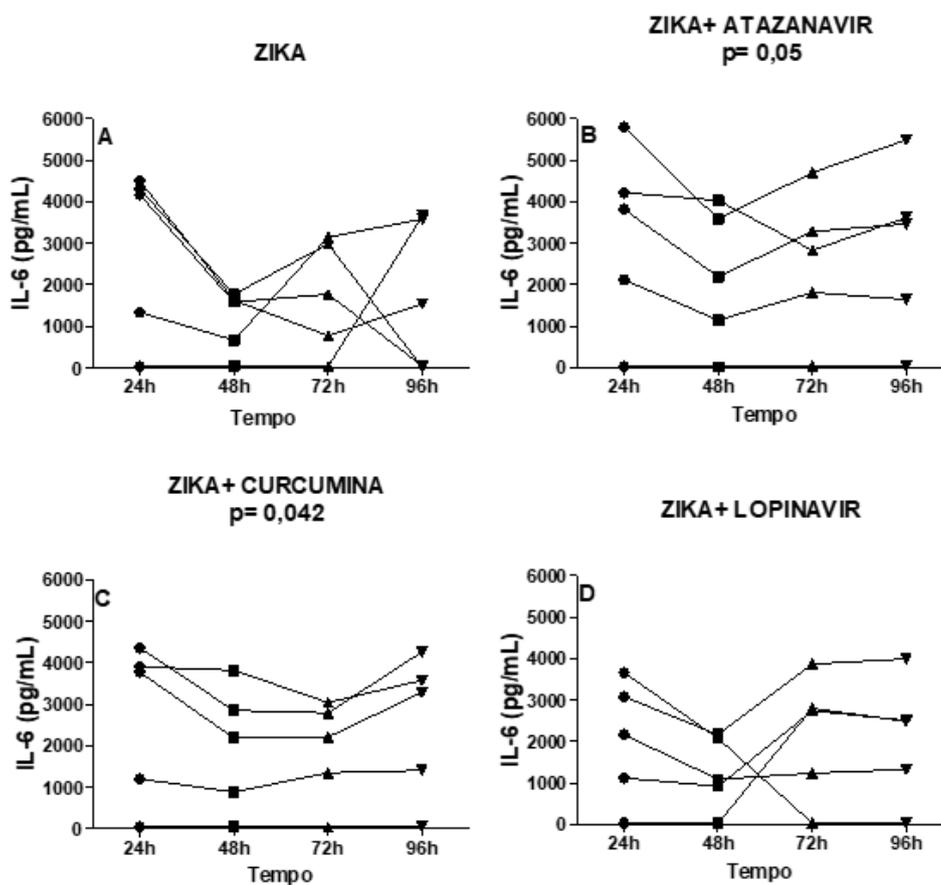


Figura 89- Cinética da produção da IL-6 pela incubação com o vírus Zika associado ou não ao tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir em células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika, avaliado por citometria

fluxo. n= 5 por grupo. A- ZIKA, p= 0,4699⁵ ; B- ZIKA+ATAZANAVIR, p= 0,05⁵; C- ZIKA+ CURCUMINA, p= 0,0420⁵; D- ZIKA+ LOPINAVIR, p= 0,6668⁵. Teste: ⁵ANOVA para Medidas Repetidas, seguido pelo método de Tukey.

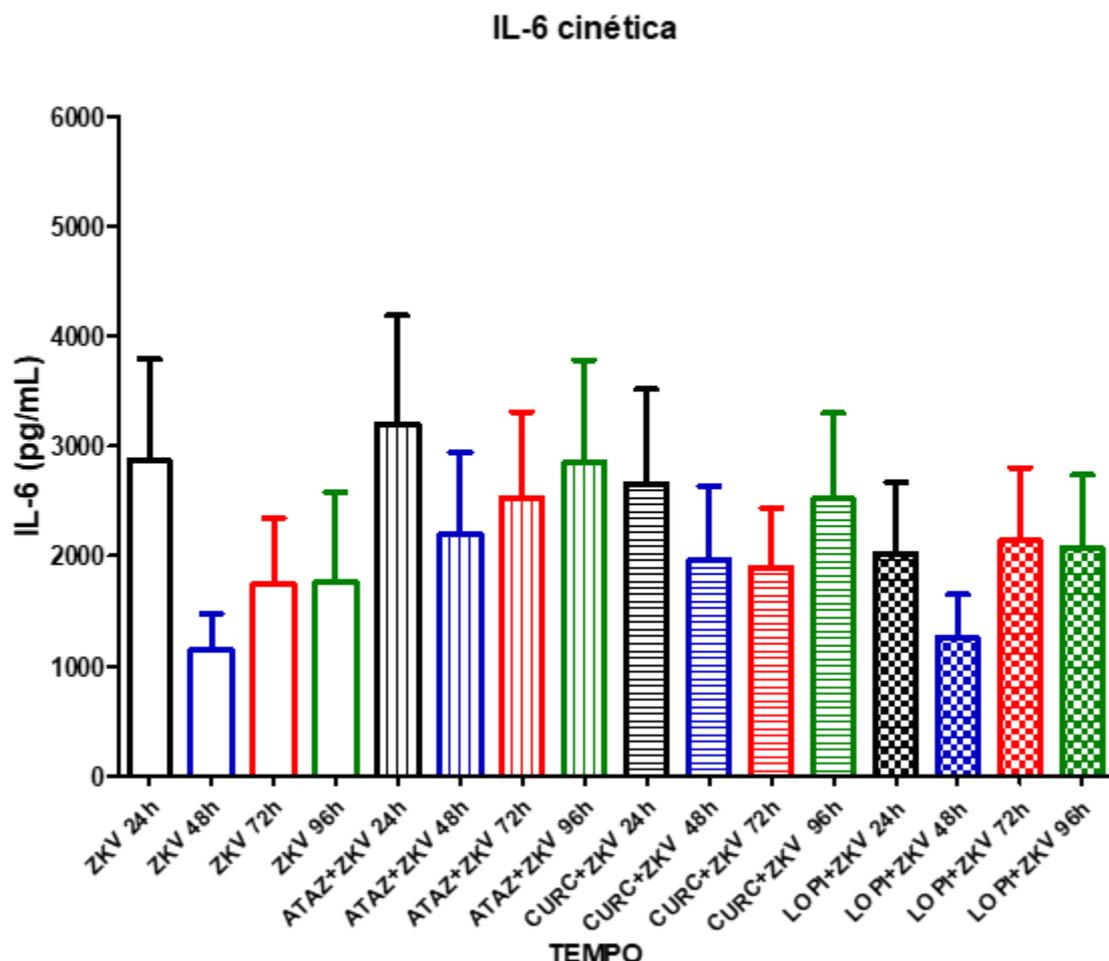


Figura 90- Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na cinética da produção de IL-6 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. Os dados estão representados em médias. Teste: ⁵ANOVA, seguido pelo método de Tukey; p=0,851.

4.9.2 TNF- α

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na cinética (24, 48, 72 e 96h) da produção da TNF- α pelas células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika.

No grupo incubado apenas com o vírus Zika, houve uma queda acentuada na produção do TNF- α observado após 48h de incubação, que se manteve muito baixo até 96 h (p=0,0046, ANOVA para medidas repetidas seguido do teste de Tukey) (figura 91 A). Para o grupo tratado com o atazanavir as respostas individuais foram mais irregulares,

embora tenham apresentado um padrão semelhante ao do vírus Zika isoladamente (figura 91 B). Quando as células foram incubadas concomitantemente com o vírus Zika e a curcumina, houve uma diminuição acentuada da produção do TNF- α , já desde a primeira avaliação com 24h de incubação, que se manteve baixa até 96 (figura 91 C). E no grupo incubado concomitantemente com o vírus Zika e o lopinavir, a cinética mostrou-se semelhante ao do vírus isoladamente (figura 91 D). Na figura 92 pode ser verificado a cinética da produção de TNF- α até 96 horas pós tratamento apresentada em gráfico de barras.

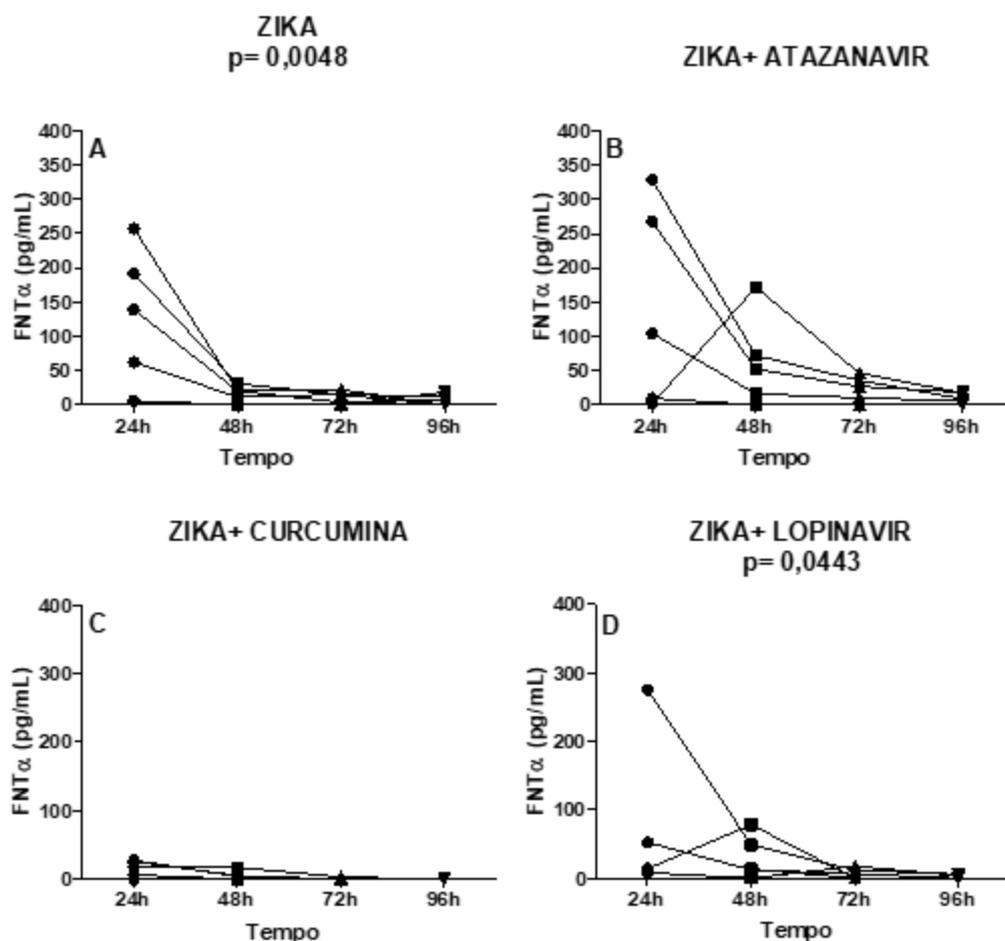


Figura 91- Cinética da produção do TNF- α analisado pela incubação com o vírus Zika associado ou não ao tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. A- ZIKA, p= 0,0048⁵ ; B- ZIKA+ATAZANAVIR, p= 0,0931⁵; C- ZIKA+ CURCUMINA, p= 0,2096⁶; D- ZIKA+ LOPINAVIR, p= 0,0443⁶. Testes: ⁵ANOVA para Medidas Repetidas, seguido pelo método de Tukey e ⁶FRIEDMAN, seguido pelo método de Dunn.

FNT α cinética
p= 0,0152

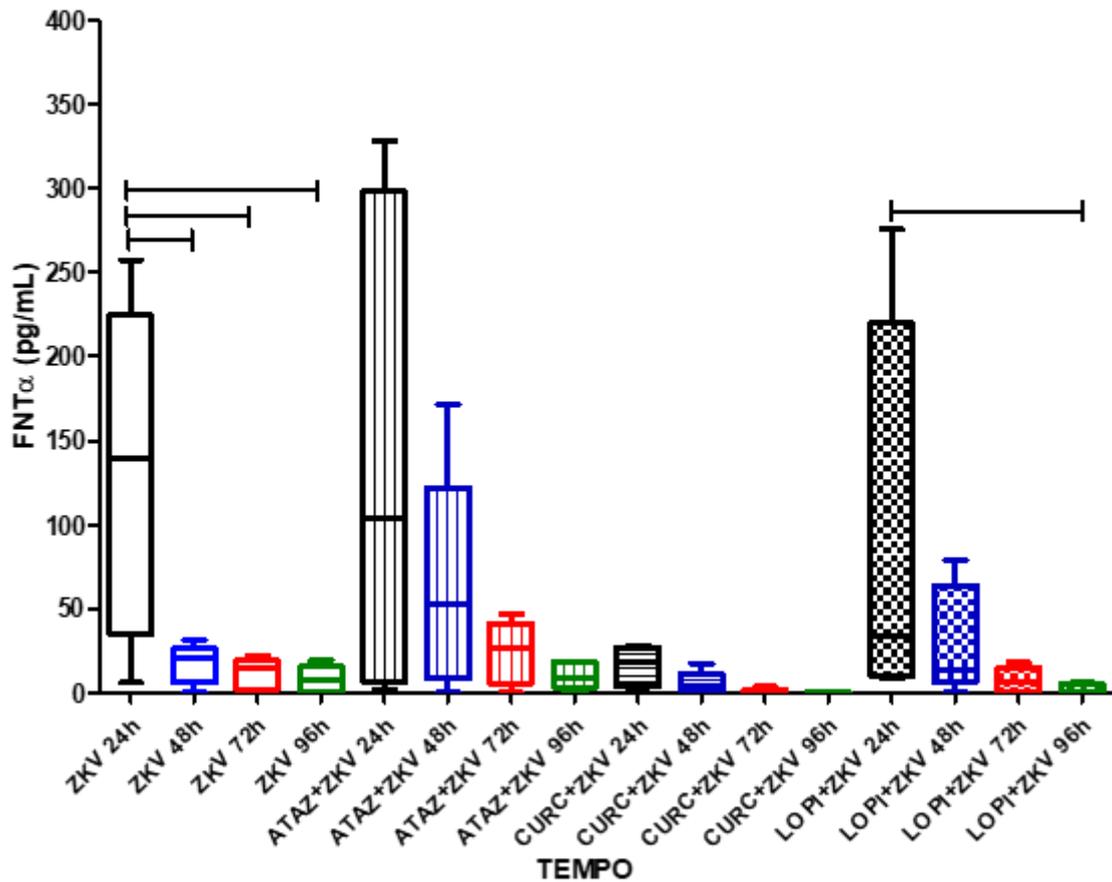


Figura 92- Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na cinética da produção de TNF- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n= 5 por grupo. p= 0,0152². As diferenças entre os grupos estão mostradas pelas barras. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

4.9.3 IL-1 β

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na cinética (24, 48, 72 e 96h) da produção da IL-1 β pelas células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika.

A concentração da IL-1 β após 48h de incubação, se manteve baixo até 96 h, porém sem mostrar diferença estatística (Figura 93). Para o grupo tratado com o atazanavir houve uma diminuição com 48h que se manteve até 96h (p=0,0135, teste de ANOVA para medidas repetidas, seguido pelo método de Tukey) (Figura 93B). Quando as células foram incubadas concomitantemente com o vírus Zika e a curcumina, as respostas individuais mostraram-se mais irregulares (Figura 93C). Enquanto que, com o tratamento

com o lopinavir, não houve diferença na produção da IL-1 β no período avaliado (figura 93D). Na figura 94 pode ser verificado a cinética da produção de IL-1 β até 96 horas pós tratamento apresentada em gráfico de barras.

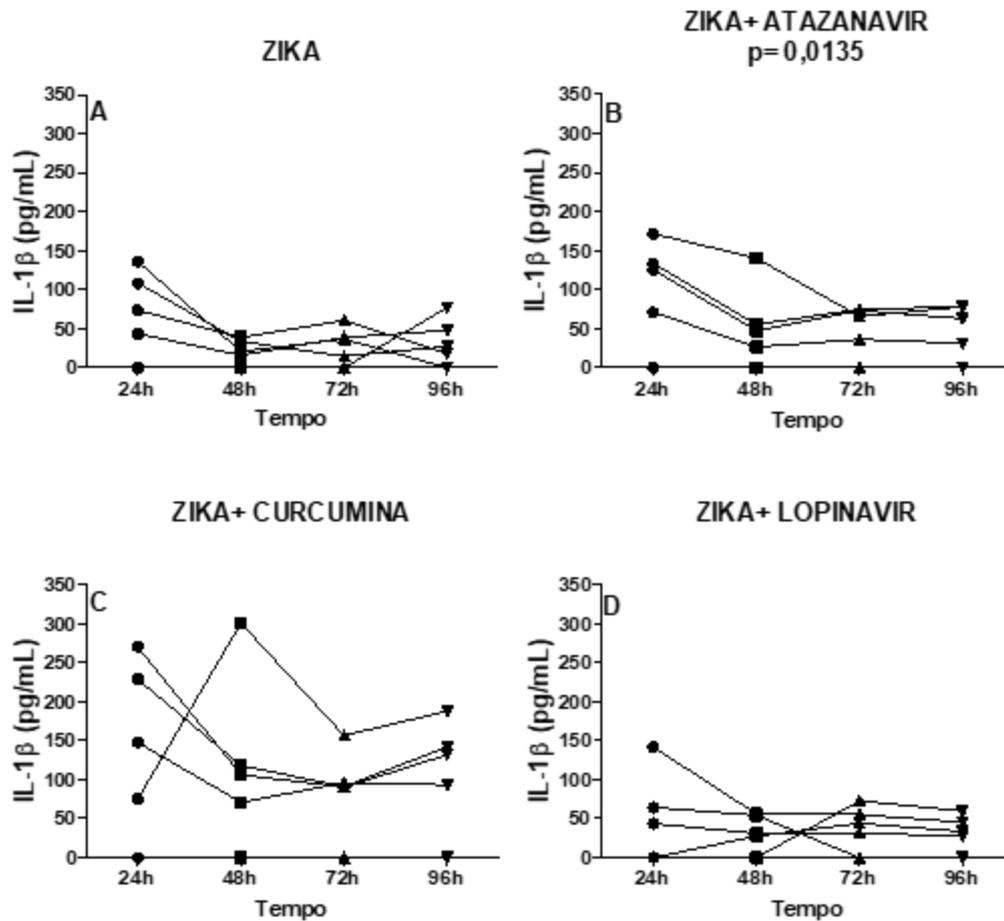


Figura 93- Cinética da produção da IL-1 β pela incubação com o vírus Zika associado ou não ao tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis infectadas in vitro com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. A- ZIKA, p = 0,1794⁵; B- ZIKA+ATAZANAVIR, p= 0,0135⁵; C- ZIKA+ CURCUMINA, p= 0,5958⁵; D- ZIKA+ LOPINAVIR, p= 0,8560⁵. Teste: ⁵ANOVA para Medidas Repetidas, seguido pelo método de Tukey.

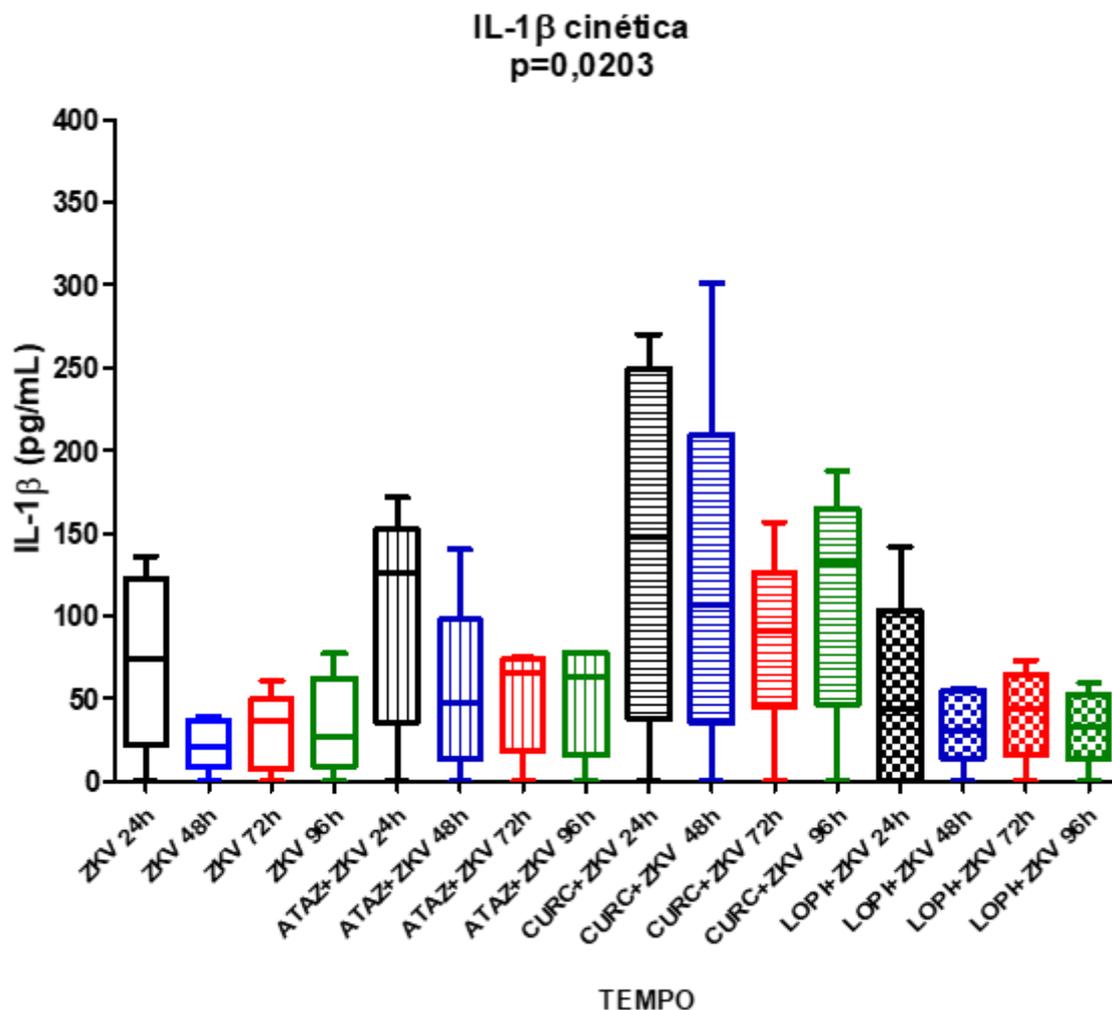


Figura 94- Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na cinética da produção de IL-1 β nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis infectadas *in vitro* com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. p= 0,0203¹. Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ¹ANOVA, seguido pelo método de Tukey.

4.9.4 IL-8

Efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na cinética (24, 48, 72 e 96h) da produção da IL-8 pelas células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas *in vitro* com o vírus Zika.

Não houve variação ao longo do tempo estudado de 96h na produção da IL-8 pelas células mononucleares do sangue periférico, nem para a incubação isoladamente com o vírus Zika nem com o tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir (Figura 95). Entretanto, os valores permaneceram elevados em todo o tempo de avaliação (Figura 96).

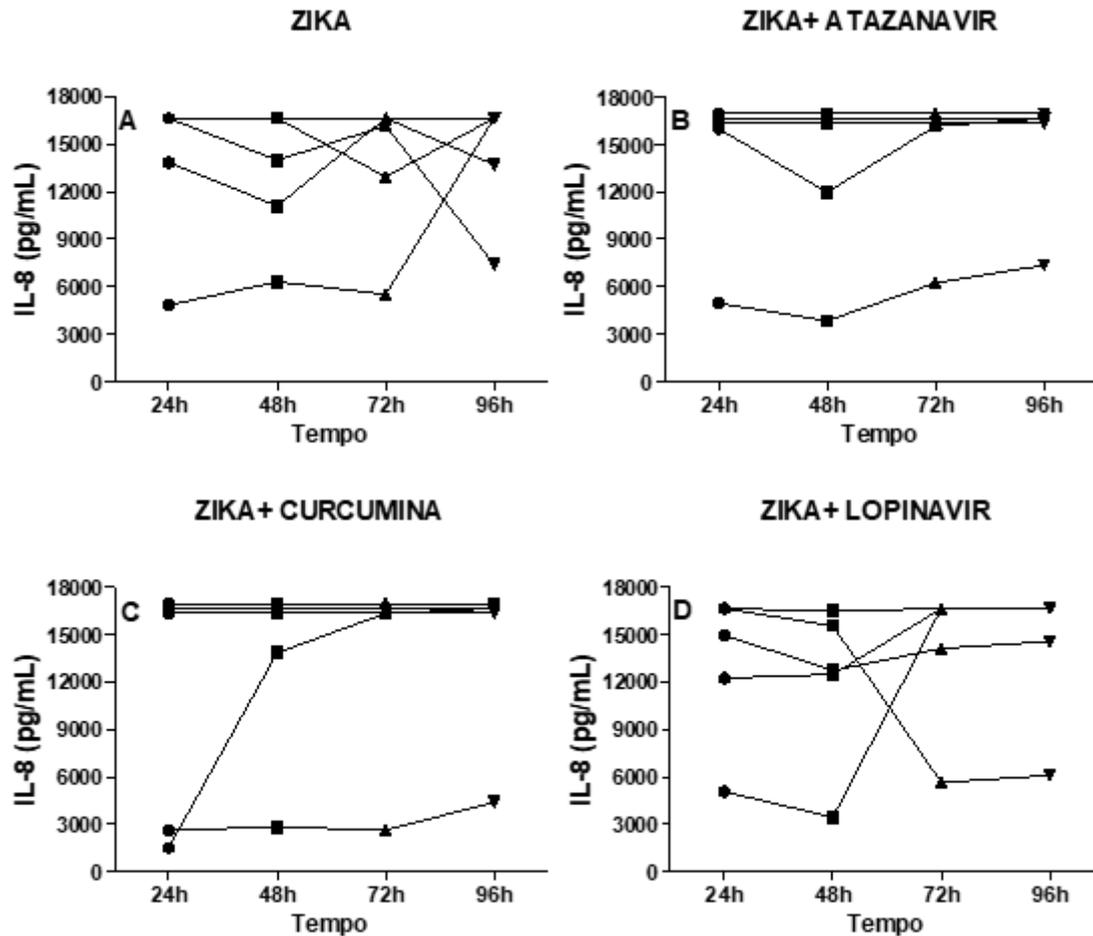


Figura 95- Cinética da produção da IL-8 pela incubação com o vírus Zika associado ou não ao tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. A- ZIKA, p= 0,9631⁵; B- ZIKA+ATAZANAVIR, p= 0,1066⁶; C- ZIKA+ CURCUMINA, p= 0,2096⁶; D- ZIKA+ LOPINAVIR, p= 0,9056⁵. Testes: ⁵ANOVA para Medidas Repetidas, seguido pelo método de Tukey e ⁶FRIEDMAN, seguido pelo método de Dunn.

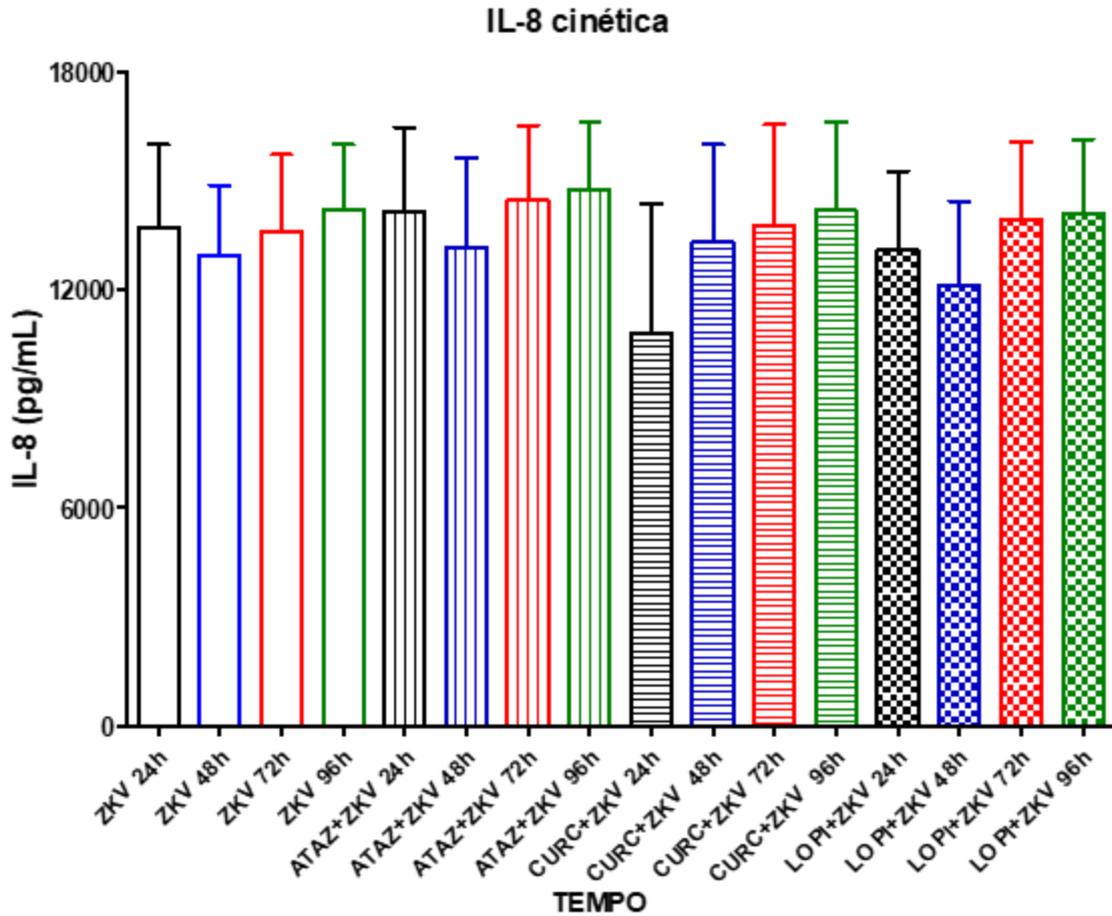


Figura 96- Comparação do efeito do tratamento com o atazanavir, curcumina e lopinavir na na cinética da produção de IL-8 nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de mulheres saudáveis incubadas in vitro com o vírus Zika, avaliado por citometria fluxo. n = 5 por grupo. p = 0,9669². Os dados estão representados em medianas, quartis e extremos. Teste: ²Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

5 DISCUSSÃO

Nosso trabalho abordou a influência da infecção pelo vírus Zika na expressão das moléculas da via do NF- κ B e na produção de citocinas pelos monócitos/macrófagos de mulheres gestantes procurando melhor compreender os efeitos da infecção na mãe que poderiam comprometer a evolução da gestação e o desenvolvimento do próprio feto e estudou o efeito da infecção pelo vírus Zika nos neuroblastomas tentando melhor compreender possíveis consequências da infecção no cérebro da criança que poderiam levar à microcefalia.

Nossos dados mostraram por microscopia eletrônica de transmissão que os neuroblastomas podem ser infectados pelo vírus Zika. Mostrou também que a incubação *in vitro* do vírus Zika com o atazanavir, a curcumina e o lopinavir inibiu o crescimento do vírus Zika *in vitro*. E analisou o efeito do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir nas vias canônica e não canônica do NF- κ B nos neuroblastomas e nos monócitos do sangue periférico de mulheres gestantes ou não e seu efeito na produção de citocinas.

Nosso trabalho mostrou pela primeira vez que os neuroblastomas SK tem como resposta constitutiva a ativação da via do NF- κ B tanto pela via canônica como não canônica, pois apresenta na situação basal, além da expressão exacerbada do c-Rel, tanto a expressão do relA/p50, que é da via canônica, como a expressão do relB/p52, que é da via não canônica, em concentrações semelhantes, além de ter maior expressão do NIK, que também pode desencadear as duas vias (Figura 61A). Na presença do vírus Zika, entretanto, ocorre predominância do relA sobre o relB (Figura 61B), indicando que o vírus pode ter manipulado a via desviando parcialmente para a via canônica, pois ainda permanecem as moléculas da via não canônica, portanto na presença do vírus Zika a via preferencial utilizada foi a via que desencadeia a resposta inflamatória. O tratamento com atazanavir dos neuroblastomas incubados com o vírus Zika aumentou a expressão do p52, que faz parte da via não canônica (relB/p52), portanto pode ter contribuído para diminuir a resposta inflamatória. No grupo curcumina+Zika o relA foi maior que o relB, desviando a via para a canônica, e associado à maior expressão do FADD do que do TRAF sugere que pode ter aumentado a apoptose, entretanto, a curcumina diminuiu intensamente a produção da citocina inflamatória TNF pelas células mononucleares das mulheres gestantes ou não (Figuras 73 C e D e 81 C). Para o lopinavir a expressão do relA, p50, relB e p52 foram semelhantes, sugerindo a ativação de ambas as vias (Figura 61 G). Os

resultados dos nossos experimentos mostraram que os neuroblastomas humanos expressaram principalmente o receptor para linfotóxina (rLTX) e predominantemente as moléculas do fator nuclear kappa B (NF- κ B): FADD, NIK, I κ B e c-Rel na situação basal, o que sugere que os neuroblastomas podem ser alvos da ação da linfotóxina e esse receptor ativa a via canônica do NF- κ B e a via não canônica por meio do NIK, assim, as moléculas expressas constitutivamente pelo neuroblastoma fazem parte tanto da via canônica quanto não canônica. Esse achado é semelhante aos resultados de Karin e cols. (2002) onde foi mostrado que a ativação da via canônica do NF- κ B é um evento frequente em células de neuroblastoma e que a inibição dessa via poderia ser uma estratégia terapêutica eficaz. Forloni e cols. (2010) também menciona a ativação constitutiva da via canônica do NF- κ B em células de neuroblastoma SK-N-BE (2). Os dados de Shih e cols. (2015) mostraram a ativação da via canônica, mas observaram também que as moléculas da via não-canônica do NF- κ B também estavam presentes em processos inflamatórios no sistema nervoso, mas esses autores não especificaram quais as células de neuroblastoma foram estudadas.

Enquanto as células de neuroblastoma SK expressaram constitutivamente o rLTX (figura 35 A), os monócitos do sangue periférico das não gestantes expressaram principalmente o receptor 1 para o fator de necrose tumoral alfa (r1TNF) (Figura 19), e os monócitos das gestantes expressaram o rLTX (Figura 25), mas não houve ativação de uma via principal do NF- κ B, pois entre as moléculas desse fator de transcrição, nenhuma mostrou-se mais elevada. Esses resultados indicam que há uma diferença na expressão dos receptores para as citocinas pró-inflamatórias entre as mulheres não gestantes e as gestantes, mas possivelmente ambas as vias NF- κ B são estimuladas na modulação da resposta imune e inflamatória.

As vias do NF- κ B podem ser estimuladas de várias maneiras, seja pelo próprio patógeno, ligando a receptores, como os receptores Toll, os receptores para padrões moleculares de patógenos ou outros, ou pelos receptores para as citocinas produzidas, particularmente, pelos receptores para o TNF, o que pode manter a ativação da via (Barnabei e cols., 2021)

Quando analisamos a expressão dos receptores para o TNF, procurando entender a ativação da via desde o seu início, nossos resultados mostraram maior expressão do receptor para linfotóxina (rLTX) nos neuroblastomas já na situação basal e após estímulo com o vírus Zika, houve discreto aumento também do r2TNF (Figura 20). A expressão

do rLTX pelas células neurais não está conclusiva na literatura, mas Xiao e cols. (2018), mostrou pela determinação da expressão do mRNA do rLTX em células-tronco/progenitoras neurais de camundongos (NSCs/NPCs) que a ativação induzida pela $LTX\alpha_1\beta_2$ da sinalização do NF- κ B nessas células indica a presença do rLTX e a expressão dessa proteína também foi detectada em NSCs/NPCs cultivadas sob condições de proliferação ou diferenciação, sugerindo que o rLTX é expresso tanto em níveis de mRNA quanto da proteína em NSCs in vitro e in vivo. Pelo fato de os neuroblastomas por nós estudados serem de linhagens de células tumorais, que tem sido mostrado expressarem o rLTX (Piao e cols, 2021) não pode ser excluído que a maior expressão desse receptor observado em nossos resultados tenha ocorrido pela origem celular estudada. A ativação da sinalização do rLTX promove a diferenciação da linhagem de células-tronco/progenitoras neurais preferencialmente pela via clássica/canônica do NF- κ B, mas poderiam ativar a via não canônica também por meio do NIK. Nossos dados ajudam a compreender as respostas neuroinflamatórias e a neurogênese moduladora da neuroimunidade e pode ajudar a entender a fisiopatologia subjacente em relação à neuroplasticidade e distúrbios neurológicos relevantes. Modular a expressão do rLTX poderia ser um potencial alvo terapêutico no futuro para o tratamento de doenças do neurodesenvolvimento, neuroinflamatórias e neurodegenerativas (Xiao e cols, 2019).

Nossos dados mostraram que o aumento do r2TNF ocorreu quando incubamos os neuroblastomas com o vírus Zika (Figura 26 B). Uma possível explicação para esse aumento ter ocorrido seria o aumento da citocina IL-6, que observamos que aumentou quando os neuroblastomas foram incubados com o vírus Zika (Figura 74). Tem sido mostrado que a IL-6 é capaz de induzir o r2TNF quando as células estão em um ambiente inflamatório. A infecção pelo vírus Zika pode desencadear uma resposta imunológica e inflamatória no sistema nervoso e algumas hipóteses podem ser sugeridas para explicar as consequências do aumento do r2TNF como parte dessa resposta: o aumento da expressão do r2TNF pelas células neurais pode proteger essas células durante a infecção viral por ativar vias de sinalização que promovem a sobrevivência e a recuperação celular; esse aumento pode compensar a desregulação da homeostase e restaurar o equilíbrio; poderia ser uma resposta das células neurais ao estresse causado pelo vírus Zika e compensar essa desregulação, restaurando o equilíbrio; como também controlar a disseminação viral. O aumento de r2TNF pode ser benéfico para a sobrevivência do vírus Zika, podendo o vírus interagir diretamente com neurônios e modular a expressão do receptor facilitando sua entrada, replicação e disseminação, ou seja, uma modulação pelo

vírus da resposta imune que vai facilitar sua sobrevivência. Entretanto, como observado para o rLTX, em malignidades hematopoiéticas e em alguns tumores sólidos, tem sido mostrado que é frequente a expressão do r2TNF, e não pode ser excluída também que sua expressão nos neuroblastomas não esteja relacionada à sua origem celular de linhagem tumoral (Wajant e cols., 2019).

O atazanavir aumentou a expressão de r1TNF em relação ao r2TNF, quando comparado aos resultados basais, porém manteve-se abaixo do rLTX. Já a curcumina e o lopinavir não modificaram a expressão dos receptores.

Nas células incubadas com o vírus Zika e tratadas com atazanavir, curcumina e lopinavir, houve aumento da expressão do r2TNF em relação aos resultados do controle, mas quando comparado ao grupo infectado com o vírus Zika e sem tratamento, não houve alteração dos níveis desse receptor, sugerindo que a infecção aumentou os níveis de r2TNF e as drogas não tiveram efeito sobre a expressão dos receptores durante a infecção.

Nos monócitos de gestantes, a incubação com vírus Zika não modificou a expressão dos receptores r1TNF, r2TNF e rLTX, nem mesmo as drogas tiveram efeito nessa expressão. O mesmo ocorreu com as células mononucleares das não gestantes.

A comparação de gestante versus não gestante, por receptor, mostrou que as não gestantes expressaram mais r1TNF que as gestantes, que não teve diferença estatística na expressão do r2TNF e que as gestantes expressaram mais o rLTX.

Na comparação entre os 3 receptores, dentro de cada grupo de estudo, nas células controle das não gestantes, ficou evidente a expressão do r1TNF diante dos outros dois, mesmo com incubação com o vírus Zika ou com tratamento com as drogas. Em contraste, as gestantes apenas tiveram maior expressão do rLTX superior aos outros receptores, no grupo incubado com Zika, sem tratamento e no grupo apenas tratado com atazanavir, sem o vírus.

Na comparação entre não gestantes e gestantes, a expressão do r1TNF na situação basal mostrou-se aumentada em não gestantes, o que foi semelhante na incubação com o Zika, ou seja, o vírus não modifica a expressão desse receptor. O atazanavir e o lopinavir diminuíram a expressão desse receptor em não gestantes, não mostrando diferença estatística com as gestantes, em comparação à situação basal, já a curcumina manteve-se semelhante ao controle. A incubação concomitante do vírus com os tratamentos reduziu o r1TNF, tornando sem significância estatística a comparação entre não gestante e gestantes (Figura 19).

A incubação com o vírus e os tratamentos com as drogas não modificaram a expressão do r2TNF na comparação entre não gestante e gestante (Figuras 21 e 22)

Nas células de não gestantes, os grupos não mostraram diferença na expressão do rLTX β , o que foi semelhante na comparação entre os grupos das gestantes (figura 48). Na comparação não gestante *versus* gestante, na situação basal, não houve diferença estatística na expressão desse receptor, entretanto, na incubação com o vírus Zika houve maior expressão do rLTX β nas células das gestantes. Também observamos maior expressão do rLTX β quando as CMSP foram tratadas com a curcumina e o lopinavir, mas para o atazanavir não houve diferença. Na incubação com o vírus Zika juntamente com o tratamento com as drogas, foram mantidos a maior expressão do rLTX β nas gestantes, como ocorreu no grupo apenas incubado com o vírus (Figura 25). No tratamento isoladamente com as drogas, houve maior expressão do rLTX β em mulheres gestantes em comparação as não gestantes quando tratadas com a curcumina e o lopinavir. Não foi encontrado na literatura uma possível explicação para as gestantes apresentarem níveis mais elevados desse receptor, no entanto, podemos supor que o aumento da expressão do rLTX β em células mononucleares de gestantes seja uma estratégia para favorecer a tolerância imunológica materno-fetal e prevenir a rejeição do feto, já que essa citocina pode induzir a produção de interleucina-10 (IL-10), que conseqüentemente pode inibir a proliferação e a função das células T efetoras e promover a diferenciação das células T reguladoras, além de inibir a produção de citocinas inflamatórias (Paolino e cols., 2005).

No estudo de Wang e cols. (2016), é citado que nas doenças autoimunes humanas, como a artrite reumatóide (AR), a expressão de LT α e LT β na sinóvia é elevada. O rLTX β ativa as vias de sinalização NF- κ B canônicas e não canônicas (Fernandes e cols, 2015).

Nesse trabalho avaliamos as moléculas que compõe a via do fator de transcrição NF- κ B FADD, TRAF, NIK, JNK e I κ B, que estão no meio do processo, e as moléculas finais da via o rel A, rel B, c-Rel, p50 e p52.

Nossos dados mostraram que a molécula FADD estava aumentada nos grupos atazanavir e lopinavir em relação ao controle e ao infectado com o vírus Zika, e permaneceu elevada no grupo infectado e tratado com o atazanavir. O lopinavir mostrou resultado semelhante ao atazanavir, entretanto, na presença do vírus Zika, retornou aos valores basais. Não observamos diferenças na expressão da molécula TRAF nos grupos de estudo. FADD e TRAF são moléculas adaptadoras paralelas na via do NF- κ B, e quando comparadas observamos uma expressão muito mais elevada do FADD nos neuroblastomas em todos os grupos do estudo. sendo importante considerar que o

FADD apresenta o domínio de morte, podendo levar a célula para a via da apoptose ou autofagia, o que poderia ser benéfico por um lado por matar a célula infectada com o vírus e controlar a infecção, mas por outro lado, se o processo for exacerbado, pioraria o risco da morte neuronal e da microcefalia. Enquanto o TRAFF não tem esse domínio. A infecção viral não modificou a expressão dessas moléculas (Figura 36). De acordo com Marín-Rubio e cols. (2019), a expressão do FADD está alterada em muitos tipos de câncer e detectado em todos os tipos de tumores analisados por sequenciamento de RNA, embora seja uma questão controversa, uma vez que tanto a superexpressão quanto a regulação negativa foram observadas, dependendo do tipo de câncer. Na maioria dos tecidos normais, os níveis de proteína FADD são baixos (Marín-Rubio e cols, 2019). No trabalho de Thorburn e cols. (2005), no qual a molécula FADD foi avaliada em células epiteliais imortais, os dados mostraram que o domínio de morte do FADD pode ativar uma via de morte celular envolvendo apoptose e autofagia, que é inativada seletivamente quando as células epiteliais normais são imortalizadas. Pelo fato de os neuroblastomas por nós estudado ser uma célula imortalizada, não podemos excluir que os níveis mais elevados do FADD inativo não seriam constitutivos dessa célula, e não alterando os níveis por influência da infecção viral. Assim, a maior expressão da molécula FADD nas células do neuroblastoma poderia refletir uma variedade de respostas celulares, incluindo a possibilidade de estar iniciando a apoptose, mecanismos de ajuste para a sobrevivência celular, resposta ao estresse ou danos, ou até mesmo para regular processos de desenvolvimento, dependendo do contexto celular e das condições em que essa expressão aumentada está ocorrendo.

A incubação com o vírus Zika não modificou a expressão do FADD nem do TRAF nos neuroblastomas (Figuras 28 e 31). Entretanto, nos neuroblastomas o FADD foi muito mais expresso do que o TRAF, tanto basal como em todos os tratamentos estudados (Figuras 34 e 35). Não houve diferença na expressão do FADD na situação basal e nem após a incubação com o vírus Zika e os três tratamentos utilizados nos monócitos das mulheres não gestantes ou gestantes (Figura 29). Entretanto, diferentemente dos neuroblastomas, observamos maior expressão basal do TRAF do que do FADD nos monócitos das gestantes do que nas não gestantes (Figura 36). E nas não gestantes a incubação com o vírus Zika aumentou a expressão do TRAF, o que não observamos nos monócitos das gestantes (Figura 33). Entretanto, nos monócitos das gestantes incubadas com o vírus Zika houve maior expressão do TRAF do que do FADD (Figura 36).

Nos neuroblastomas, o atazanavir e o lopinavir isoladamente aumentaram a expressão do FADD, mas no grupo Lopi+ZKV houve reversão desse aumento (Lopi > Lopi+ZKV (Figura 28). Nos monócitos das não gestantes, ocorreu o inverso, o grupo Lopi+ZKV > Lopi. E nos monócitos das mulheres gestantes o ataz < controle (Figura 30).

Outro aspecto que chama a atenção é que a intensidade de fluorescência média tanto do FADD quanto do TRAF foi muito mais intensa nos neuroblastomas do que nas CMSP.

Ao comparar os resultados obtidos entre não gestantes e gestantes, o grupo atazanavir incubado com vírus Zika e o grupo curcumina dos monócitos das não gestantes mostraram maior expressão de FADD do que as gestantes. Ao analisar a expressão da molécula TRAF nas CMSP das mulheres não gestantes, o grupo incubado com o vírus Zika apresentou maior expressão do TRAF do que o grupo controle não incubado com o vírus e grupo lopinavir+zika expressou mais TRAF que o grupo lopinavir (figura 63A). Para as gestantes, o controle apresentou maior expressão do TRAF do que o grupo tratado apenas com atazanavir (figura 53B). Na comparação da produção de TRAF, apenas o grupo controle mostrou diferença estatística, sendo a gestante a maior produtora dessa molécula (Fig. 54). Na comparação entre FADD e TRAF entre gestante e não gestante apenas no grupo atz+ZKV observamos maior expressão estatisticamente significativa do TRAF do que do FADD (figura 55B).

A superexpressão de FADD, como a mostrado em nossos estudos, pode levar a consequências indesejáveis, pois, de acordo com Ranjan (2012), em seu estudo com células de rim embrionário humano, ele mostrou que a superexpressão de FADD atenua a expressão da proteína anti apoptótica cFLIP e ativa a cascata de caspases extrínseca para execução da apoptose dessas células, ou seja, aumento de morte celular. Entretanto, Ranjan e cols. (2012), chama a atenção para o fato de que expressão regulada de FADD está envolvida no desenvolvimento embrionário, sobrevivência celular, proliferação, progressão do ciclo celular, inflamação, imunidade inata, necrose e autofagia, e um defeito na expressão dessa molécula pode contribuir para o desenvolvimento de condições patológicas e sua expressão aumenta a proliferação celular.

No estudo de Ranjan, (2016), em que foi usada células de rim embrionário, os resultados mostraram que o FADD leva a transdução da sinalização de morte celular apoptótica independente da estimulação do TNF- α . Os nossos dados mostraram que o neuroblastoma não produziu TNF e apresentou altos níveis de expressão do FADD.

Entretanto, os monócitos mostraram aumento da produção do TNF na presença do vírus Zika. A incubação com o vírus Zika não modificou a expressão de NIK e JNK nos neuroblastomas (Figuras 38 e 41). Entretanto, nos neuroblastomas o NIK foi muito mais expresso do que o JNK, tanto basal como em todos os tratamentos estudados (Figura 45). Nos neuroblastomas, o lopinavir isoladamente ou na incubação com o vírus aumentaram a expressão do JNK, em relação ao basal (Lopi e Lopi+ZKV > CONT) (Figura 41). Nos monócitos das não gestantes e das gestantes não houve modificação nos níveis de expressão de JNK (Figura 42). O NIK, normalmente está associada ao TRAF2 e mostrou ativar potentemente o NF- κ B quando superexpresso. A expressão de formas de NIK com defeito em cinase bloqueia a ativação de NF- κ B (e IKK sempre que testada) em resposta à maioria dos indutores, incluindo TNF- α , então presume-se que a NIK esteja diretamente envolvida na ativação do NF- κ B (Karin, 2000).

Não houve diferença na expressão do NIK na situação basal e nem após a incubação com o vírus Zika e nos três tratamentos utilizados nos monócitos das mulheres não gestantes ou gestantes (Figura 39). Entretanto, diferentemente dos neuroblastomas, observamos que os monócitos não mostraram diferenças na expressão de NIK e JNK no basal das mulheres gestantes e das não gestantes (Figura 46). Nas mulheres não gestantes a incubação com o vírus Zika não alterou a expressão do JNK, e o mesmo foi observado nos monócitos das gestantes (Figura 42). Entretanto, nos monócitos das gestantes incubadas concomitantemente com a curcumina e com o vírus Zika houve maior expressão de JNK do que do NIK (Figura 47). Na comparação dos grupos das não gestantes *versus* os grupos de gestante, apenas o lopinavir das não gestantes expressou maior produção de NIK do que as das gestantes (Figura 40). Não houve diferença estatística na molécula JNK entre os grupos das não gestantes, o que se repetiu entre os grupos das gestantes (Figura 43). A intensidade de fluorescência média tanto do NIK quanto do JNK foi mais intensa nos neuroblastomas do que nas Monócitos.

Nos neuroblastomas, não houve diferença estatística na expressão da molécula NIK entre os grupos, não sofrendo influência pela incubação com o vírus Zika ou pelo tratamento com as drogas. Já para a molécula JNK houve aumento pelo tratamento com lopinavir, que se manteve após a incubação com o vírus Zika e o lopinavir quando comparada ao grupo controle, mas os níveis de expressão não foram estatisticamente diferentes quando comparados com o grupo Zika. Comparando JNK e NIK, observamos que os neuroblastomas expressaram níveis maiores de NIK, apresentando diferenças significativas em quase todos os grupos estudados. Nessa comparação entre NIK e JNK,

é possível verificar que nos grupos tratado com lopinavir e infectado com Zika e tratado com curcumina, não houve diferença estatística entre as duas moléculas.

Das moléculas sequenciais na via do NF- κ B, NIK e JNK, observamos que nos neuroblastomas a expressão do NIK foi mais evidente, entretanto, a incubação *in vitro* com o vírus não modificou estatisticamente a expressão dessas moléculas (Figura 45). Essas duas moléculas fazem parte de vias diferentes do NF- κ B, a molécula JNK está ligada a via canônica e pode fosforilar e ativar a proteína IKK β (cinase I κ B β) e a molécula NIK está ligada a ativação da via não canônica e tem um papel crucial na ativação do complexo IKK α (cinase I κ B α). De acordo com Sun e cols. (2012) e Vallabhapurapu e cols (2009), as moléculas NIK e JNK estão envolvidas nas duas vias de NF- κ B, mas com funções distintas. A molécula NIK ativa a via não canônica de NF- κ B ao fosforilar o IKK α , que por sua vez cliva o p100 em p52. JNK é uma cinase que ativa a via canônica ao fosforilar o p65, aumentando a sua atividade transcricional. O rLTX é um receptor que ativa a NIK, que por sua vez ativa a via não canônica de NF- κ B (Sun e cols., 2012) e também ativa outros receptores da família do TNF, como o CD40, o BAFFR e o RANK (Vallabhapurapu e cols., 2009).

Não houve variação significativa na expressão do I κ B das gestantes e das não gestantes, (Figura 50) e na comparação entre os níveis de expressão entre as gestantes versus não gestantes, também não foram diferentes, ou seja, o período gestacional não modificou a expressão do I κ B, os valores foram mantidos como nas mulheres não gestantes (Figura 50).

O I κ B atua como um inibidor do NF- κ B, ligando-se ao complexo p50/p65 no citoplasma e impedindo a sua translocação para o núcleo, onde ele ativa a transcrição de genes alvo, ou seja, ele impede a migração das moléculas finais para o núcleo (Hayden e cols, 2012). A molécula I κ B é regulada por vários estímulos celulares, como citocinas, estresse oxidativo, radiação UV e infecções virais e esses estímulos ativam IKK, que fosforila o I κ B e o marca para degradação pelo proteassoma, deixando o complexo p50/p65 livre para translocar para o núcleo e ativar a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória e na sobrevivência celular (Hayden e cols., 2012).

Nossos resultados mostram que a infecção pelo Zika aumentou a expressão do I κ B em relação ao controle, atazanavir e curcumina. A associação da droga com a infecção, curcumina+zika *versus* curcumina e lopinavir+zika *versus* controle, também mostrou aumento em relação aos grupos que receberam apenas o tratamento e o grupo controle

basal. Esses dados sugerem que a infecção dos neuroblastomas pelo vírus Zika é capaz de reduzir os níveis de ativação das moléculas do NF- κ B ao aumentar o I κ B, que impede as moléculas das vias finais de migrarem para o núcleo, e que nessas células, o atazanavir, a curcumina e o lopinavir não tiveram efeito sobre essa molécula. No estudo de Gim e cols. (2019), eles examinaram melhor como o Zika induz a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, por meio da investigação da fosforilação de I κ B, um fenômeno crítico na cascata de sinalização do NF- κ B e de fato, a infecção causou a fosforilação robusta de I κ B em macrófagos primários derivados de medula óssea de camundongos e células gliais mistas, sugerindo que o Zika desencadeia a indução de citocinas pró-inflamatórias de maneira dependente da via do NF- κ B. As proteínas I κ B são conhecidas como reguladoras da atividade do NF- κ B. Eles se ligam firmemente aos dímeros de NF- κ B, até que a fosforilação N-terminal responsiva ao estímulo por IKK desencadeie sua ubiquitinação e degradação proteossomal (Mathes, 2008), ou seja, se o I κ B não for fosforilado ele retém as moléculas finais do NF- κ B no citoplasma, mas se a via for ativada e o I κ B for fosforilado vai aumentar as moléculas finais migrando para o núcleo.

Mathes e cols. (2008) mostraram em células imortalizadas 3T3, que duas vias de degradação controlam o nível de I κ B α , a degradação de I κ B α livre não é controlada por IKK ou ubiquitinação, mas intrinsecamente, pela sequência C-terminal conhecida como domínio PEST e a ligação de NF- κ B a I κ B α mascara o domínio PEST do reconhecimento proteossomal, impedindo a degradação independente da ubiquitina; I κ B α ligado requer então fosforilação e ubiquitinação de IKK para degradação basal lenta. Além disso, mostraram que tanto o I κ B α livre quanto o ligado são substratos semelhantes para o IKK, e a fosforilação preferencial do I κ B α ligado ao NF- κ B é devida à estabilização do I κ B α pelo NF- κ B. A estabilização de I κ B α livre pode inibir a ativação de NF- κ B. A via de degradação de I κ B α livre é um determinante da sinalização NF- κ B responsiva ao estímulo. Ajustar o nível de I κ B α livre na célula pode fornecer oportunidades para sinalização cruzada. Sinais não inflamatórios podem afetar a capacidade de resposta da célula a estímulos inflamatórios que regulam o NF- κ B. O uso de uma abordagem combinada pode ajudar a compreender a capacidade de resposta diferencial das células em condições de estresse (Mathes e cols, 2008). Nossos resultados mostraram que a incubação dos neuroblastomas com o Zika provocou aumento de expressão de I κ B, sugerindo que esse estímulo tenha causado a fosforilação da molécula. Utilizamos o anticorpo para a molécula P50 fosforilado e embora a infecção viral não tenha mostrado diferença estatística em relação ao controle, notou-se que em MONÓCITO de não

gestantes ela pode aumentar sua expressão e nas MONÓCITO de gestantes ocorreu o oposto e esse dado relacionado aos achados de Mathes e cols. (2008), sugere que o I κ B não age nessas condições sobre a ativação da molécula P50.

O vírus Zika tem tropismo pelas células cerebrais, particularmente pelas células progenitoras neurais, levando ao comprometimento do crescimento cerebral que pode resultar em microcefalia e outros distúrbios neurológicos, ele é capaz de infectar quase todos os tipos de células do cérebro, incluindo astrócitos, micróglia, células endoteliais microvasculares cerebrais, pericitos, oligodendrócitos e neurônios (Ojha e cols., 2018).

O I κ B é uma molécula fundamental na evolução da via do NF- κ B, pois sua ativação libera as moléculas citoplasmáticas para migração para o núcleo, e nossos dados mostraram que a incubação com o vírus ZIKA aumentou a expressão do I κ B (Figura 48). Uma possível explicação para esse aumento seria uma resposta fisiológica da célula aumentando a molécula I κ B quando o neuroblastoma está infectado com vírus Zika, pois, com a inibição do prosseguimento da ativação da via do NF- κ B pelo vírus, favoreceria a sobrevivência celular e a resistência à morte induzida pelo vírus.

Na avaliação das moléculas finais das vias do NF- κ B vimos que em células de neuroblastoma, o grupo basal (controle) teve alta expressão da molécula c-Rel (Figura 60A), já nos monócitos de gestantes e não gestantes, nenhuma das moléculas se destacou, mantendo uma expressão equilibrada entre elas (Figura 61 A).

Quando avaliado a expressão dessas moléculas na incubação com o vírus Zika, os neuroblastomas continuaram a expressar o c-Rel, porém houve redução de expressão da molécula relB (Figura 57 B), enquanto os monócitos de não gestantes mostraram um pequeno aumento da molécula relA, o que se repetiu na avaliação das gestantes (Figura 54 B). Como citado por Baska (2022) p65 relA está aumentado em infecções por parasitos, inclusive na malária cerebral e toxoplasmose, o que pode ser prejudicial para o feto no início da gestação.

Nos tratamentos das células com as drogas atazanavir, curcumina e lopinavir, sem a incubação com Zika, o atazanavir, nos neuroblastomas mantiveram a expressão da molécula c-Rel elevada, mas a molécula p52 mostrou um leve aumento de expressão (Figura 69 C) e esse mesmo tratamento em monócitos das não gestantes promoveu aumento de expressão da molécula p52 e nas gestantes aumentou a molécula relA (Figura 70C). O tratamento dos neuroblastomas com a curcumina manteve c-rel elevado, com leve aumento de p52 e relA (Figura 69 E), enquanto os monócitos de não gestantes e gestantes mostraram aumento apenas da molécula relA (70E). Já no tratamento dos

neuroblastomas com lopinavir, houve redução da molécula c-rel, mas ainda se destacou em relação a molécula de relB (figura 69G) e nos monócitos de não gestantes nenhuma das moléculas estava mais expressa, enquanto nas gestantes, a molécula relA estava aumentada (Figura 70G).

Nas comparações com o grupo controle (basal), os neuroblastomas incubadas com o vírus Zika (ZKV) apresentaram redução de relB e os monócitos de não gestantes e gestantes aumentaram a expressão de p65relA. Em outras infecções também foi demonstrado o aumento de relA, como foi citado por Baska (2022), que pacientes com malária cerebral (MC) apresentam translocação aumentada de p65relA para o núcleo em neurônios, células gliais, células epiteliais e leucócitos e essas alterações se correlacionam com alterações histopatológicas no cérebro, com NF- κ B p65relA modulando a apoptose em células endoteliais cerebrais e leucócitos intravasculares durante a malária cerebral. Na MC o aumento da translocação de p65relA e p50 para o núcleo e a degradação de I κ B α ocorrem em monócitos após exposição a trofozoítos ou hemozoína, coincidindo com o aumento da atividade da metaloproteinase-9 da matriz de monócitos e o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α e a quimiocina CCL20, efeitos também importantes para a patogênese da malária e o papel completo do NF- κ B durante a infecção depende do tipo de célula e provavelmente é influenciado pela cepa do parasita e pela genética do hospedeiro. Na infecção de macrófagos por *T. cruzi* há aumento de p65relA e IL-12 e outras citocinas quando a infecção é em outros tipos celulares. Na infecção de monócitos por *T. gondii* ocorre acúmulo de p65relA no núcleo e a fosforilação dessa molécula, com aumento de produção de IL-1 β . Na infecção de monócitos por *L. major* ocorre a inibição da atividade de ligação ao DNA do heterodímero p50/p65, a indução do heterodímero p50/p50 e p50/c-Rel, a expressão de p65relA e relB, a regulação positiva de genes que codificam inibidores da via NF- κ B e o aumento da secreção de IL-10 e TNF- α (Baska, 2022).

Na comparação do basal com os tratamentos, no atazanavir, os neuroblastomas apresentaram aumento de p52 e os monócitos de não gestantes aumentaram relA e p52 e as gestantes aumentaram relA, na curcumina, os neuroblastomas e os monócitos de não gestantes aumentaram p52 e relA, enquanto nas gestantes aumentaram relA e no lopinavir, os neuroblastomas aumentaram relA, p50 e p52 e os monócitos de não gestante não mostrou variação e das gestantes reduziram relB. Ainda comparando ao basal, o grupo incubado com ZKV e tratado com atazanavir, nos neuroblastomas teve redução de relA, relB e p50, nos monócitos de não gestantes aumentou relA e reduziu relB e nas

gestantes aumentou relA, no tratado com curcumina e incubado com ZKV, no neuroblastoma aumentou relA e p52 e nos monócitos de não gestantes e gestantes aumentou relA e no tratado com lopinavir e incubado com o ZKV, no neuroblastoma aumentou p50 e p52 e nos monócitos de não gestantes não teve diferença e nas gestantes aumentou relA.

Nas comparações com o grupo infectado com Zika (ZKV), nos grupos onde as células foram apenas tratadas com as drogas, o atazanavir promoveu nos neuroblastomas redução de relB, relA e p50 e os monócitos das não gestantes aumentou o p50 e nas gestantes reduziu o relB, com a curcumina, os neuroblastomas promoveram aumento de p52 e relA e os monócitos de não gestantes não teve diferença e as gestantes reduziram relB e com lopinavir, os neuroblastomas aumentaram p50 e p52 e os monócitos de não gestantes reduziram relA, enquanto nas gestantes reduziu relB. Na comparação com o incubado com ZKV, o grupo incubado com ZKV e tratado com atazanavir, nos neuroblastomas teve aumento de p52 e redução de relA e nos monócitos de não gestantes, não teve diferença e nas gestantes reduziu relB, no tratado com curcumina, o neuroblastoma aumentou relA e levemente o relB e nos monócitos de não gestantes reduziu relA e nas gestantes reduziu relB e no tratado com lopinavir, no neuroblastoma aumentou p50 e p52 e nos monócitos de não gestantes reduziu relA e nas gestantes reduziu relB.

Na comparação das células apenas tratadas com atazanavir *versus* células incubadas com ZKV e tratadas com atazanavir, nos neuroblastomas observou-se a redução de c-Rel e nos monócitos das não gestantes aumentou p50 e nas gestantes não teve diferença. Na comparação das células apenas tratadas com curcumina *versus* células incubadas com ZKV e tratadas com curcumina, nos neuroblastomas observou-se o aumento de relA e p50 e nos monócitos das não gestantes reduziu relA e nas gestantes não teve diferença. Na comparação das células apenas tratadas com lopinavir *versus* células incubadas com ZKV e tratadas com lopinavir, nos neuroblastomas observou-se o aumento de c-Rel e redução de relA e nos monócitos das não gestantes e gestantes, não teve diferença.

Desses resultados, concluímos que associação das drogas com vírus promoveram o aumento na expressão de p50. Um estudo *in vitro* com a curcumina investigou seu efeito na infecção pelo vírus Zika em células neurais humanas e os resultados mostraram que a curcumina foi capaz de inibir a replicação do vírus Zika e proteger as células neurais da morte celular induzida pelo vírus. A curcumina também modulou a expressão de vários

genes relacionados à resposta imune, incluindo p52, bem como genes envolvidos na neurogênese e na neuroproteção, sugerindo um potencial neuroprotetor contra os danos causados pelo vírus Zika no sistema nervoso central (Mounce e cols., 2017). O aumento da expressão de p52 em células infectadas com Zika e tratadas com essas substâncias é que elas podem induzir uma resposta imune celular mais intensa e prolongada contra o vírus.

Esses resultados sugerem que o aumento da expressão de p52 pode ter um papel benéfico na defesa contra o vírus Zika, mas também pode estar associado a um processo inflamatório crônico que pode causar danos ao sistema nervoso central. Portanto, é importante entender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da transcrição gênica pelo NF- κ B e suas subunidades, como o p52, para desenvolver novas estratégias terapêuticas para a infecção pelo vírus Zika.

Diferentes complexos NF- κ B estão envolvidos na neurodegeneração de maneiras diferentes. Alguns complexos, como p50/RelA, contribuem para a morte celular induzida por estímulos pró-apoptóticos, enquanto outros, como c-Rel, aumentam a resistência das células neuronais lesadas. Os complexos NF- κ B têm papéis distintos na lesão pós-isquêmica e na neuroproteção (Sarnico e cols., 2008).

A subunidade RelA pode ter funções opostas na regulação da expressão gênica anti-apoptótica, dependendo da sua fosforilação e associação com co-repressores ou coativadores. Sarnico (2008), sugere que essa regulação pode afetar a especificidade do gene alvo para diferentes dímeros de NF- κ B em células neuronais, com implicações para doenças neurológicas e propõe que identificar os mecanismos moleculares que controlam a ativação e a atividade transcricional de diversos dímeros de NF- κ B em células neuronais pode revelar novos alvos potenciais para tratar essas doenças (Sarnico e cols., 2008).

Nossos resultados foram semelhantes aos de um estudo com células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), no qual foi observado que a infecção pelo vírus Zika induziu a ativação e a translocação nuclear de c-Rel, assim como de outros membros da família NF- κ B, sugerindo que a infecção pelo Zika pode desencadear uma resposta imune celular mediada por NF- κ B em células neuronais, possivelmente como um mecanismo de defesa (Oldenkamp e cols., 2017). Por outro lado, em um estudo com células-tronco neurais humanas (hNSCs), foi demonstrado que a infecção pelo vírus Zika levou à diminuição da expressão de c-Rel e de outros membros da família NF- κ B, assim como à redução da atividade transcricional de NF- κ B (Cardeti e cols., 2016). Os resultados desses achados e os resultados de nossos testes indicam que a infecção pelo vírus Zika pode

inibir a via de sinalização de NF- κ B em células progenitoras neurais, possivelmente como um mecanismo de escape da resposta imune e de indução da apoptose celular. Portanto, a maior expressão da molécula c-Rel pelos neuroblastomas, infectado ou não com vírus Zika, pode ter diferentes significados dependendo do tipo celular e do contexto da infecção, podendo significar uma resposta imune celular contra o vírus ou uma regulação da apoptose celular. Os dímeros c-Rel promovem especificamente a transcrição do gene Bcl-xL (Sarnico e cols., 2008).

As citocinas que estão envolvidas na via canônica e não canônica do NF- κ B são: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF (Corazza, 2021). Essas citocinas podem ter efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios, dependendo do contexto da infecção pelo vírus Zika. Dentre as citocinas que foram quantificadas nos experimentos com MONÓCITO, as que deram leitura dentro dos limites de detecção dos kits foram IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF, as quimiocinas MCP-1 e Rantes. E para os neuroblastomas, as citocinas que apresentaram produção dentro dos limites de detecção foram IL-8, IL-6, IL-12p70, IFN- γ e IL-17A. Não houve diferença significativa na expressão das citocinas IL-12p70, IFN- γ e IL-17A entre os grupos estudados com a célula de neuroblastoma.

Na avaliação da produção da citocina IL-8 pelas mononucleares em não gestantes e também em gestantes, houve aumento da IL8 quando as células foram incubadas com vírus Zika em comparação ao basal, ao atazanavir, a curcumina e ao lopinavir. Nas células das não gestantes, houve aumento da IL-8 no grupo que foi infectado com o Zika e tratado com a curcumina em relação ao basal e o grupo apenas tratado com esse composto e nas gestantes o grupo atazanavir+ Zika aumentou em relação ao controle e ao atazanavir, e o grupo curcumina+zika aumentou em relação ao controle e curcumina e o lopinavir +Zika aumentou em relação ao controle e lopinavir. Já nas células de neuroblastomas que foram incubados com o vírus Zika também houve aumento da produção da IL-8, possivelmente como parte da resposta fisiológica do neuroblastoma à infecção viral. A associação das drogas com o vírus (atazanavir+Zika, curcumina+Zika e lopinavir+Zika) aumentou a produção da IL-8 em relação às drogas isoladamente e a curcumina diminuiu a expressão de IL-8 em relação ao controle e o grupo lopinavir+zika diminuiu a expressão da IL-8 em relação à infecção viral.

Na comparação não gestante *versus* gestante, para saber qual produziu mais IL-8 entre todos os grupos de estudos, as gestantes produziram mais essa citocina, e quando as células foram incubadas com Zika, a produção aumentou ainda mais. Esses resultados mostraram que a infecção viral pelo Zika aumentou a produção de IL-8 e ela está

aumentada nas gestantes, seja em condições basais, na presença do vírus ou no tratamento com as drogas.

Analisando gestantes e não gestantes basais, com os grupos que foram tratados com as drogas, o atazanavir reduziu a IL-8 em gestantes e o lopinavir em não gestantes, o que não foi evidente na interação droga+vírus, mostrando que elas atuam apenas sobre as células e não sobre o vírus na produção dessa citocina (figura 82).

A IL-1 β foi produzida pelas mononucleares e não foi produzida pelos neuroblastoma. Nas mononucleares de não gestantes, esteve aumentada apenas no grupo incubado com Zika e tratado com curcumina (curc+zkv) em relação ao basal, já nas gestantes, o grupo Zika e o grupo curc+Zkv produziram mais essa citocina que o controle, e o grupo ataz+zkv produziu mais que os grupos controle, zkv e atazanavir. Na comparação entre não gestante e gestante, nos grupos ataz+zkv, curc+zkv e lopi+zkv, as concentrações da IL-1 β das gestantes foram superiores. Esses resultados sugerem que nas gestantes, essa citocina aumenta quando combinado incubação com Zika e tratamento com as drogas, mas eles, isoladamente, não mostraram diferença estatística.

Na comparação controle de não gestantes e gestantes versus Zika de gestantes e não gestantes não foram evidentes a diferença de expressão de IL-1 β , nem mesmo comparando os grupos apenas tratados com a droga com o basal e também na comparação da interação droga+vírus com o que foi apenas incubado com o mesmo IL-1 β . Esse aumento da IL-1 β nas células de gestantes incubadas com o vírus Zika pode estar ligada a ativação do NF- κ B, pois, segundo Karin e cols. (2000), a IL-1 β é um importante mediador de inflamação e potente ativador do NF- κ B, exercendo seus efeitos através da interação com receptores de superfície celular e a ausência dela pode implicar na ativação do NF κ B por outros meios, como TNF e LPS. A infecção dos macrófagos e células gliais pelo vírus Zika levou ao aumento dos níveis de transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, pela ativação da sinalização do NF- κ B (Gim e cols., 2019).

A IL-6 foi expressa tanto por mononucleares quanto por neuroblastoma, porém em mononucleares não houve diferença estatística na sua expressão, entre os grupos das não gestantes, entretanto, nas gestantes, o grupo apenas infectado com o vírus teve aumento dessa citocina em relação ao basal e ao atazanavir e o grupo curc+zkv produziu mais que o controle e curc, e o grupo lopi+zkv produziu mais que lopi e controle. Em células de neuroblastoma, os dados mostraram que a infecção pelo Zika aumentou a produção de IL-6 em relação ao basal, aos grupos sem infecção que foram tratados com

curcumina e/ou lopinavir e aos grupos com associação, curcumina+zika e lopinavir+zika. Nesse tipo celular, todas as 3 drogas apresentaram níveis significativos de diminuição de IL-6 em relação ao basal, mas não em relação à infecção. A curcumina+zika produziu mais IL-6 que a curcumina sozinha e lopinavir+zika também produziu mais IL-6 do que o lopinavir sozinho.

Na relação não gestantes e gestantes, os grupos zkv, ataz, ataz+zkv, curc+zkv, lopi+zkv e lopi, as gestantes produziram mais a citocina IL-6 que as não gestantes, sugerindo que na incubação com o vírus, no tratamento e na combinação de ambos, os níveis de IL-6 aumentaram, mas sem influência desses fatores os níveis são próximos às das não gestantes. A comparação controle de gestante e não gestante com o Zika das mesmas, notou-se que o vírus atua provocando aumento da expressão da IL-6 em gestantes e a curcumina e o lopinavir sozinhos atuam para aumentar esses níveis nas gestantes, também relacionando ao basal. A incubação das células de gestantes e não gestantes com o vírus, comparado à interação vírus + droga, os valores não sofreram diferenças significativas. Fu e cols. (2020), estabeleceram os índices de referências para níveis séricos de IL-6 em mulheres grávidas, fornecendo uma referência para equipes médicas clínicas e profissionais de laboratório e nesse estudo é afirmado que o nível sérico de IL-6 em mulheres grávidas saudáveis é maior do que o de mulheres saudáveis não grávidas, e o nível de IL-6 que estão no segundo e terceiro trimestre é maior do que no primeiro, o que confirma o perfil encontrado em nossos experimentos, onde as gestantes produziram mais IL-6 do que as não gestantes.

Fu e cols (2020) cita que estudos mostraram que os níveis de IL-6 são mais elevados em mulheres grávidas com diabetes gestacional e hipertensão gestacional do que em mulheres grávidas saudáveis e o nível de IL-6 está associado ao resultado da gravidez e à pressão arterial sistólica. Em um estudo, o nível médio de IL-6 foi maior em mulheres com ruptura prematura de membranas do que em mulheres grávidas saudáveis e estas informações nos chama atenção sobre o aumento de IL-6 na infecção com o vírus Zika, ou seja, as patologias em geral podem aumentar a produção dessa citocina e consequentemente aumentar a ativação de NFκB.

Uma das mais importantes citocinas que está relacionada com a via do NFκB é fator de necrose tumoral (TNF), que foi produzido pelos monócitos, mas não pelo neuroblastoma. A produção aumentada dessa citocina quando há uma infecção foi evidente em gestantes, onde o grupo zkv aumentou a produção dessa citocina em relação aos grupos controle (basal), atazanavir e curcumina, não mostrando diferença estatística

com os grupos que também foram incubados com o vírus e tratados com uma das drogas do estudo. Entre os grupos das gestantes, a incubação com o vírus produziu maiores níveis de TNF que os grupos não incubados, controle, atazanavir, curcumina e lopinavir. Na comparação gestantes *versus* não gestantes, a primeira expressou mais TNF que a segunda, em todos os grupos que receberam o vírus Zika (zkv, ataz+zkv, curc+zkv e lopi+zkv). Esses dados evidenciaram que a infecção viral está relacionada aos níveis de TNF no organismo.

Na comparação entre não gestantes e gestantes, relacionando a incubação com vírus e o basal, notou-se que a partir da interação das células com o vírus Zika, as células passaram a produzir mais TNF, o que ficou evidente nas gestantes. Essa mesma comparação com o basal, porém sendo relacionada às drogas, não foi evidente que as mesmas promoveram efeito significativo para o aumento ou redução dessa citocina. Em relação à interação vírus+drogas comparadas apenas à incubação com o vírus, não foi notado diferença na produção do TNF, sugerindo que apenas o Zika é capaz de aumentar essa produção e as drogas não atuam durante a infecção para reduzi-la (figura 88).

No estudo de Tappe e cols. (2016), foram analisadas as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em pacientes infectados pelo vírus Zika (ZIKV) usando a biologia de sistemas e foi encontrado uma elevação das citocinas IL-7, IL-9, IL-17a, RANTES, IP-10 e IL-1ra nos pacientes com ZIKV na fase aguda da infecção, indicando uma ativação polifuncional das células T e B. já o nosso estudo mostrou um aumento da IL-1 β nas mononucleares infectadas com ZIKV, o que pode estar relacionado com a ativação do inflamassoma, uma plataforma que libera IL-1 β e IL-18 maduras. Essas citocinas podem induzir a produção de outras citocinas inflamatórias, como TNF e IL-6, que também estavam aumentadas em nosso estudo.

Tappe e cols. (2016) observou que os níveis de IL-2, IFN- γ e TNF- α foram mais baixos do que o esperado na infecção pelo ZIKV, contrastando com outras infecções arbovirais, pois essas citocinas têm efeito antiviral direto e podem induzir a morte de células infectadas. Em nosso trabalho observamos aumento do TNF das mononucleares incubados com ZIKV, o que pode indicar uma tentativa de eliminar o vírus, mas também pode causar inflamação sistêmica e danos aos tecidos. Ainda nos estudos de Tappe (2016), foi relatado que os níveis de RANTES e IP-10 estavam elevados na infecção pelo vírus Zika, sugerindo o recrutamento e a ativação de células T efectoras, pois essas quimiocinas se ligam aos receptores CCR5 e CXCR3 nas células T. Diferentemente, em nosso estudo não houve diferença estatística na produção dessas

quimiocinas, houve aumento da MCP-1 nas mononucleares infectadas com o vírus Zika, que é outra quimiocina que recruta monócitos e macrófagos para o local da infecção, promovendo a fagocitose e a apresentação de antígenos. Como no trabalho de Tappe as quimiocinas foram determinadas no sangue periférico e no nosso trabalho nos sobrenadantes das células mononucleares do sangue periférico, é possível que a fonte das quimiocinas por ele observada tenha sido produzida por outros tipos celulares diferentes das mononucleares.

Foi verificado por Tappe e cols. (2016) que os níveis de IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e IP-10 estavam aumentados na infecção pelo vírus Zika, semelhante ao observado na dengue e essas citocinas podem ter efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios, dependendo do contexto. Nosso trabalho também mostrou aumento da IL-6 e IL-8 nos neuroblastomas e nas mononucleares incubadas com o vírus Zika. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que estimula a resposta imune contra o vírus Zika, mas também pode estar envolvida na microcefalia fetal. A IL-8 é uma quimiocina que recruta neutrófilos e monócitos para o local da infecção, aumentando a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio.

No estudo de Oliveira e cols. (2019) foi avaliada a produção de citocinas pró-inflamatórias no soro de pacientes infectados pelo vírus Zika e observou um aumento de IL-7, IL-9, IL-17a, RANTES e IP-10 nos indivíduos infectados com o vírus Zika, sendo que não houve diferença estatística na produção das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6 e IL-15, IL-12(P70), IL-8, TNF- α , INF- γ e eotaxina quando comparadas ao grupo controle. Esses resultados diferem do nosso estudo, já que as células de neuroblastoma produziram IL-8 e IL-6 na incubação com o vírus Zika e a IL-17A, IL-12p70 e IFN γ foram produzidas apenas por algumas amostras do controle, e não houve diferença significativa entre os grupos. E observamos aumento das citocinas IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, MCP-1 pelas mononucleares. Possivelmente as diferenças observadas deveram-se a que os soros estudados por Oliveira foram obtidos de pacientes possivelmente em fases diferentes da doença ou quadros mais leves. E de fato, Kam e cols. (2017) mostraram maior aumento de IL-8, IL-6, TNF- α e MCP-1 em pacientes com infecção pelo vírus Zika que estavam febris e os níveis de MCP-1 e TNF- α foram também mais elevados em mulheres gestantes de fetos com possíveis malformações.

As quimiocinas foram avaliadas apenas nas mononucleares. Em não gestantes, a incubação com o vírus Zika aumentou a produção da quimiocina MCP1 (CCL2), em

relação aos grupos atazanavir e lopinavir e nas gestantes o Zika foi superior ao atazanavir.

Na comparação entre os grupos de não gestante com os grupos gestantes, apenas o atazanavir das gestantes foi superior ao das não gestantes. O atazanavir nas gestantes e não gestantes *versus* o controle das mesmas atuou para reduzir a expressão do MCP1 (figura 90)

Não houve diferença na produção de RANTES ou CCL5 entre os grupos das não gestantes e entre os grupos de gestante, e a comparação entre elas também não teve relevância estatística (figuras 92 e 93)

Em nosso trabalho não detectamos a produção de IL-10 pelas mononucleares e pelos neuroblastomas, entretanto, Oliveira e cols. (2019) analisando o plasma sanguíneo de pacientes infectados com Zika mostrou que a infecção viral aumentou a produção de IL-10 pelos leucócitos, o que pode suprimir a resposta imune inata e favorecer a persistência viral. Portanto, as citocinas produzidas pelas vias do NF- κ B em neuroblastos e monócitos podem ter um papel importante na patogênese da infecção pelo vírus Zika. Nos nossos resultados, observamos que os neuroblastomas produziram apenas na situação basal, as citocinas IFN- γ e IL-17A, que podem ter um papel protetor contra a infecção viral, estimulando a resposta imune celular e a produção de óxido nítrico, o que indica que elas são expressas constitutivamente pelos neuroblastos, e que as drogas e o vírus Zika não interferiram na sua produção. No trabalho de Brandetti e cols., 2021, os autores trataram neuroblastoma com IFN e TNF, e embora tenha induzido a regulação positiva do FAS nessas células e, conseqüentemente, aumentado a apoptose mediada pelas células NK, desencadeou processos de evasão imune, incluindo a forte regulação positiva do MHC classe I e IDO1, ambos os quais estão envolvidos em mecanismos que levam ao comprometimento de uma morte adequada mediada por células NK de neuroblastomas.

Para análise da infecção neuronal por ZIKV e suas conseqüências na sinalização imune inata, Kung e cols. (2022) analisaram a expressão gênica para identificar as vias mais afetadas pela infecção, como as citocinas IFN- β , IL-6, e TNF- α e o NF- κ B. Eles também confirmaram que essas vias foram ativadas no cérebro de camundongos infectados com ZIKV, mostrando uma forte resposta imune inata dos neurônios. Os autores sugeriram que essas citocinas podem influenciar a função e o comportamento do cérebro.

A via canônica do NF- κ B é ativada por infecção viral e induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF, que podem contribuir para a

resposta imune e o controle viral, mas também para a lesão tecidual e a inflamação crônica (Hyden e cols,2014; Kulms e cols, 2006; Lawrence, 2009). A via não canônica do NF- κ B induz a produção de fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-12p70, que podem promover a sobrevivência celular, a diferenciação e a resolução da inflamação (Hyden e cols,2014; Kulms e cols, 2006; Lawrence, 2009). Em nosso estudo, os neuroblastomas expressaram citocinas de ambas as vias, tanto na situação basal quanto na infecção. A infecção pelo vírus Zika pode interferir na sinalização das vias do NF- κ B e alterar o equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Das citocinas da via não canônica, o neuroblastoma apresentou apenas na situação basal a discreta produção de IL12p70 e da via canônica produziu IL-6 e IL-8, mostrando diferenças da infecção para o basal e também para os tratamentos.

A avaliação dos níveis de citocinas produzidas pelas células mononucleares incubadas com o vírus Zika, tratadas ou não, com atazanavir, curcumina e lopinavir, ao longo do período de 96 horas, mostrou que na incubação somente com o vírus houve uma diminuição da produção da IL-6 após 24 horas de incubação com o vírus Zika, e embora com valores individuais um pouco irregular, houve uma tendência a manter seus níveis mais baixos nos períodos de 48h, 72h e 96h. Nas células incubadas com o vírus e tratadas com atazanavir e as tratadas com curcumina, houve redução na produção dessa citocina entre os períodos de 24h para 48h, mas os valores retornaram aos níveis iniciais nos períodos de 72h e 96h.

De acordo com Gim (2019), a IL-6 está aumentada nas primeiras 24 horas de infecção com o vírus Zika em macrófagos e células gliais e esse aumento pode refletir uma resposta imune inicial ao vírus, possivelmente como parte da resposta inflamatória inicial do organismo, consequentemente facilitando limitar a sua replicação e disseminação. No entanto, a IL-6 diminui em 48, 72 e 96 horas após a infecção, o que pode sugerir uma regulação negativa da sua expressão pelo vírus, ou alternativamente uma degradação da proteína, ou pode estar associada à indução de outras citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4, que podem inibir a produção da IL-6 e promover a resolução da inflamação. Essa diminuição poderia evitar uma inflamação excessiva e prolongada, que poderia ser prejudicial para o hospedeiro.

Esses resultados sugerem que a IL-6 tem um papel importante na resposta imune e inflamatória em resposta à infecção pelo vírus Zika, mas que a sua produção é dinâmica e dependente do tempo de infecção. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação da IL-6 na infecção pelo vírus Zika poderá contribuir para o

desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas na modulação da resposta imune.

Em relação ao TNF α , houve aumento nas primeiras 24 horas de incubação com vírus Zika, mas observamos redução drástica em 48 horas, e que se manteve nos períodos de 72 horas e 96 horas de observação. Embora esse perfil de produção de TNF tenha ocorrido nas incubações com as drogas, os resultados mostraram diferenças estatísticas apenas entre 24h e 96 horas no tratamento com lopinavir. O tratamento com a curcumina, surpreendentemente diminuiu acentuadamente a produção do TNF desde sua primeira avaliação com 24h. O TNF estava aumentado nas primeiras 24 horas de infecção pelo Zika, possivelmente como parte da resposta imune inata do organismo ao vírus. Mas seus níveis reduziram drasticamente ao longo dos dias, possivelmente como uma resposta regulatória do próprio organismo diminuindo os riscos dos efeitos adversos ao organismo se mantido em níveis elevados. Diferente de nossos resultados, que não observamos produção de TNF pelas células do neuroblastoma in cultura, no trabalho de Kung (2022) foi observado que a infecção pelo vírus Zika induziu a produção de TNF- α pelas células neuronais, tanto in vitro quanto in vivo, e que esse sinal inflamatório alterou a expressão de genes neurais relacionados a transtornos psiquiátricos, como transtorno bipolar e esquizofrenia. O aumento de citocinas inflamatórias na gestação pode ter um papel patogênico importante, pelo risco de estimular um parto precoce e perda fetal. O fato de a curcumina diminuir intensamente a produção do TNF, poderia ter um papel importante para a preservação da gravidez na eventualidade de infecção pelo vírus Zika na gestação. Considerando a lesão neuronal, a diminuição do TNF teria possivelmente um papel protetor da morte neuronal (Corazza, 2020)

Em Karin e cols. (2000) é citado que embora o TNF- α tenha dois receptores distintos, r1TNF e r2TNF, na maioria dos tipos de células a ativação do NF- κ B ocorre principalmente pelo r1TNF. Assim, a característica comum na sinalização através do r1TNF e rIL-1 é a utilização de proteínas TRAF, mas em nossos estudos a sinalização ocorreu por meio de FADD e aumento da expressão do receptor rLTX em neuroblastomas e mononucleares de gestantes. Nas mononucleares de não gestante, a ativação ocorreu r1TNF e a literatura mostra que esse receptor interage com a proteína do domínio de morte associada ao r1TNF (TRADD), que funciona como um adaptador para o recrutamento de outras proteínas, incluindo a proteína de interação com o receptor (RIP), uma serina/treonina cinase e TRAF2 (Karin, 2000).

A produção de IL-1 β não variou ao longo das 96 horas de incubação com o vírus Zika. Nas culturas incubadas com o vírus Zika e tratadas com o atazanavir após um pequeno pico com 24h, houve redução dessa citocina durante as 96 horas, ocorrendo maior variação entre 24h e 48h. Essa citocina pró-inflamatória é produzida pelas células mononucleares em resposta à infecção, como mostrado para o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV). A IL-1 β pode induzir a ativação e a proliferação de células T, e também pode aumentar a expressão de receptores para entrada do HIV nas células, facilitando a infecção viral. Em relação ao vírus Zika, não encontramos na literatura outro estudo analisando a cinética da IL-1 β para esse vírus. Toksoy e cols., em 2017, mostrou que o atazanavir tem um efeito inibitório sobre a produção de IL-1 β por células mononucleares infectadas pelo HIV *in vitro*. O estudo mostrou que o atazanavir reduziu significativamente os níveis de IL-1 β no sobrenadante das culturas celulares a partir de 24 horas após a infecção e o tratamento com o fármaco, em comparação com o grupo controle sem tratamento. O estudo sugeriu que o atazanavir pode ter um papel anti-inflamatório na infecção pelo HIV, além do seu efeito antiviral (Toksoy e cols., 2017). A cinética da IL-1 β observada por nós com o vírus Zika foi semelhante ao que foi observado para o HIV.

Analisando a cinética da IL-8, observamos que os níveis da IL-8 em mononucleares na infecção pelo vírus Zika estavam elevados desde 24h de incubação e mantiveram-se elevados até 96 h e não foram alterados pelos tratamentos com o atazanavir, curcumina ou lopinavir,

No trabalho de Schett e cols. (2013), que analisou o papel da IL-6 na inflamação sistêmica e nas doenças crônicas e de Kato (2006), que investigou os mecanismos moleculares da resposta imune inata ao vírus da influenza A, mostraram que a IL-6 pode ativar o fator de transcrição NF- κ B, e ambos mostram que a IL-6 induziu a expressão de TNF, IL-1 e IL-8. Nossos dados corroboram os resultados desses autores pois mostraram que as mononucleares incubadas com o vírus Zika produziram as citocinas inflamatórias IL-6, IL-8, TNF e IL-1 β em níveis elevados. Esses achados sugerem que a produção de IL-6, IL-8, TNF e IL-1 pelas mononucleares é uma resposta imune e inflamatória à infecção pelo vírus Zika, que pode ter implicações para o controle viral e para o desenvolvimento de doenças neurológicas associadas ao vírus. No entanto, ainda são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na regulação dessas citocinas pelas mononucleares incubadas com o vírus Zika, bem como os efeitos dessas citocinas na interação entre as células imunes e as células nervosas.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas ao interpretar os resultados. Primeiro, o uso de neuroblastoma, que é uma célula neoplásica, pode não refletir completamente a resposta imune em células normais. Entretanto, a impossibilidade de obtenção dessa célula sendo de origem cerebral leva a uma dificuldade intrinsecamente, e sendo o neuroblastoma de origem humana, possivelmente mostrou resultados mais fidedignos do que a obtenção dessas células de modelos animais. Além disso, o tamanho da amostra é pequeno, o que pode limitar a generalização dos resultados. Apenas parte das moléculas das vias do NF- κ B foi analisada, o que pode não fornecer uma visão completa da resposta imune. Essas limitações devem ser levadas em consideração ao interpretar os resultados e ao planejar futuras pesquisas.

As alterações na expressão dos receptores podem ter implicações na resposta imunológica e inflamatória durante a infecção pelo vírus Zika e no desenvolvimento de tratamentos para a doença. É necessária uma investigação mais aprofundada para entender melhor os mecanismos subjacentes a essas alterações e para avaliar o potencial de direcionamento desses receptores como estratégias terapêuticas.

Embora em nosso trabalho não tenha sido utilizado anticorpos para as moléculas fosforiladas, o fato de termos observado aumento da produção das citocinas IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF e da quimiocina MCP-1, que são produzidas pela ativação das vias do NF- κ B, é sugestivo de que elas estavam exercendo sua atividade biológica.

Mais estudos são necessários para compreender os mecanismos envolvidos nessa regulação e o impacto dessas alterações nas respostas celulares e nas doenças associadas ao Zika. Os resultados sugerem também, que essas moléculas podem desempenhar papéis importantes em diferentes processos biológicos. No entanto, é necessário realizar mais estudos para entender melhor os mecanismos moleculares envolvidos e as implicações clínicas desses achados

6 CONCLUSÕES

As imagens de microscopia eletrônica de neuroblastoma incubado com o vírus Zika mostraram a presença do vírus no citoplasma dessa célula, confirmando a capacidade do Zika de infectar esse tipo celular.

Na avaliação da inibição do crescimento do vírus, a curcumina, o atazanavir e o lopinavir inibiram o crescimento do vírus em cultivos de célula C6/36 nas primeiras horas de tratamento e ao longo de 96 h de incubação.

No estado basal dos neuroblastomas, o rLTX teve maior expressão do que o r2TNF que teve maior expressão do que o r1TNF ($rLTX > r2TNF > r1TNF$). Quando os neuroblastomas foram incubados com o vírus Zika, a expressão do rLTX foi igual à do r2TNF e ambos tiveram maior expressão do que o r1TNF ($rLTX = r2TNF > r1TNF$) (Figura 26).

No estado basal, os monócitos do sangue periférico das mulheres não gestantes apresentaram expressão oposta ao que foi observado para a expressão dos receptores nos neuroblastomas, sendo que o $r1TNF > r2TNF > rLTX$. (Figura 45), mas o $r1TNF > r1TNFG$ (Figura 27) e o $rLTX < rLTXG$. Quando os monócitos das não gestantes foram incubadas com o vírus Zika, a expressão do $r1TNF > r2TNF = rLTX$, portanto, o oposto do que foi observado para a resposta dos neuroblastomas à incubação com o vírus Zika.

Quando os monócitos foram tratados com o atazanavir, curcumina e lopinavir isoladamente, a expressão dos receptores foi: $r1TNF > r2TNF = rLTX$, que foi o mesmo efeito observado quando da incubação com o vírus Zika.

Nos neuroblastomas o FADD foi muito mais expresso do que o TRAF, tanto basal como em todos os tratamentos estudados (Figuras 34 e 35). Entretanto, diferentemente dos neuroblastomas, observamos maior expressão basal do TRAF do que do FADD nos monócitos das mulheres gestantes do que nas não gestantes (Figura 33). Entretanto, nos monócitos das gestantes incubadas com o vírus Zika houve maior expressão do TRAF do que do FADD (Figura 36).

Nos neuroblastomas, o atazanavir e o lopinavir isoladamente aumentaram a expressão do FADD, mas no grupo Lopi+ZKV houve reversão desse aumento ($Lopi > Lopi+ZKV$) (Figura 28). Nos monócitos das não gestantes, ocorreu o inverso, o grupo $Lopi+ZKV > Lopi$. E nos monócitos das gestantes o $atz < controle$ (Figura 36).

Outro aspecto que chama a atenção é que a intensidade de fluorescência média tanto do FADD quanto do TRAF foi muito mais intensa nos neuroblastomas do que nos monócitos.

Ao comparar os resultados obtidos entre não gestantes e gestantes, o grupo atazanavir incubado com vírus Zika e o grupo curcumina dos monócitos das não gestantes mostraram maior expressão de FADD do que os das gestantes. Ao analisar a expressão da molécula TRAF nos monócitos das mulheres não gestantes, o grupo incubado com o vírus Zika apresentou maior expressão do TRAF do que o grupo controle não incubado com o vírus e grupo lopinavir+zika expressou mais TRAF que o grupo lopinavir (figura 32A). Para as gestantes, o controle apresentou maior expressão do TRAF do que o grupo tratado apenas com atazanavir (figura 32B). Na comparação entre FADD e TRAF entre gestante e não gestante apenas no grupo ZKV observamos maior expressão estatisticamente significativa do TRAF do que do FADD (figura 36B).

Nos neuroblastomas, o NIK foi muito mais expresso do que o JNK, tanto basal como em todos os tratamentos estudados (Figura 45). Nos neuroblastomas, o lopinavir isoladamente e na incubação com o vírus aumentou a expressão do JNK, em relação ao basal (Lopi e Lopi+ZKV > CONT) (Figura 44). Entretanto, diferentemente dos neuroblastomas, observamos que os monócitos não mostraram diferenças na expressão de NIK e JNK no basal das mulheres gestantes e das não gestantes (Figura 46). Entretanto, nos monócitos das gestantes incubadas concomitantemente com a curcumina e com o vírus Zika houve maior expressão de JNK do que do NIK (Figura 47). Na comparação dos grupos das não gestantes *versus* os grupos de gestante, apenas o lopinavir das não gestantes expressou maior produção de NIK do que as gestantes (figura 46). A intensidade de fluorescência média tanto do NIK quanto do JNK foi mais intensa nos neuroblastomas do que nos monócitos.

Quando os neuroblastomas foram incubadas com o vírus Zika, houve aumento na expressão do receptor 2 para TNF (r2TNF), enquanto apenas nos monócitos de não gestantes a expressão de r1TNF aumentou.

O atazanavir manteve a expressão do rLTX elevada nos neuroblastomas e aumentou a expressão do r2TNF em relação ao r1TNF nos monócitos de não gestantes. Com o tratamento com a curcumina e o lopinavir houve maior expressão do rLTX nos neuroblastomas, e houve também maior expressão de r2TNF em relação a r1TNF. Nas gestantes, não houve diferença na expressão dos receptores após os tratamentos.

Ao comparar com o grupo controle basal, observamos que a incubação com o vírus Zika aumentou a expressão do r2TNF nos neuroblastomas, enquanto nos monócitos de não gestantes a expressão do r2TNF diminuiu. O atazanavir reduziu a expressão de r2TNF nos neuroblastomas e nos monócitos de não gestantes, enquanto a curcumina aumentou a expressão de r2TNF nos neuroblastomas e reduziu nos monócitos de não gestantes. O lopinavir aumentou a expressão do r2TNF em ambos os tipos de células.

Nas comparações com o grupo infectado com Zika, o atazanavir reduziu a expressão do r2TNF nos neuroblastomas e nos monócitos de não gestantes, enquanto a curcumina aumentou a expressão do r2TNF nos neuroblastomas e nos monócitos de não gestantes. O lopinavir aumentou a expressão do r2TNF em ambos os tipos de células.

Portanto, concluímos que o vírus Zika e as drogas atazanavir, curcumina e lopinavir podem modular a expressão dos receptores para linfotóxina (rLTX) e TNF nas células de neuroblastoma e monócitos.

Nos neuroblastomas incubados com o vírus Zika, houve redução da expressão da molécula relB, enquanto no tratamento com atazanavir observou-se um leve aumento da expressão de P52. Já no tratamento com curcumina, houve aumento da expressão de c-Rel, P52 e relA. Por fim, no tratamento com lopinavir, houve redução da expressão de c-Rel e destaque da molécula relA.

Na análise comparativa entre gestantes e não gestantes, foi observado que os monócitos de gestantes, incubados com o vírus Zika e tratadas com atazanavir, curcumina ou lopinavir, bem como os grupos apenas tratados com curcumina ou lopinavir, apresentaram um aumento significativo na expressão do rLTX em comparação ao grupo controle basal. Quanto aos grupos de não gestantes, observou-se que os monócitos apenas tratados com atazanavir apresentaram uma redução na expressão do r1TNF. Porém, os monócitos tratados com lopinavir, lopinavir+Zika, curcumina+Zika e atazanavir+Zika apresentaram um aumento na expressão do r1TNF em comparação ao grupo controle basal.

A expressão aumentada do rLTX em monócitos de gestantes infectadas com Zika, atazanavir + Zika, curcumina, curcumina + Zika, lopinavir e lopinavir + Zika em relação às não gestantes pode ter implicações importantes para o tratamento de mulheres grávidas infectadas com o vírus Zika, sugerindo que a expressão aumentada desse pode ser uma resposta do corpo à infecção pelo vírus Zika, e que isso pode ser explorado para desenvolver novas terapias para mulheres grávidas infectadas com o vírus Zika (Figura 25).

Esses resultados destacam as complexas interações entre as moléculas c-Rel do NF- κ B e os diferentes grupos de células, incluindo gestantes e não gestantes, bem como os efeitos variáveis das diferentes intervenções farmacológicas. As descobertas oferecem novos *insights* sobre os mecanismos de resposta ao vírus Zika e os efeitos de tratamentos específicos em diferentes contextos celulares.

A infecção pelo vírus Zika aumentou a produção da IL-8 e IL-6, nos neuroblastomas e nas células mononucleares do sangue periférico de gestantes e não gestantes.

O tratamento com atazanavir produziu um efeito variável na expressão das citocinas IL-8 e IL-6, com algumas condições não apresentando alterações significativas em relação ao grupo controle. Curiosamente, o tratamento com lopinavir também teve efeitos distintos, reduzindo a expressão de IL-8 em neuroblastomas, mas não afetando a expressão de IL-6. A curcumina, por sua vez, pareceu ter um impacto mais consistente na redução da expressão de IL-8, especialmente em neuroblastomas.

Em relação às citocinas TNF e MCP-1 nos monócitos, a infecção pelo Zika promoveu o aumento da produção de TNF em todos os grupos estudados (Figura 83) e as gestantes produziram mais essa citocina que as não gestantes (Figura 84) e a infecção com Zika promoveu aumento de produção de MCP-1 pelos monócitos de não gestantes e nas gestantes (Figura 83).

No estudo de cinética de citocinas produzidas por CMSP de mulheres durante 96h, o grupo apenas infectado com o vírus Zika produziu IL-6 durante todo período da infecção, o atazanavir manteve a produção mais homogênea durante todo o período, mantendo sempre elevado e o lopinavir teve resultado semelhante ao grupo que só recebeu o vírus e não foi tratado. O TNF nas primeiras 24 h estava muito aumentando, porém teve queda brusca nas 48, 72 e 96 horas, o que se repetiu nos tratamentos com atazanavir e lopinavir, mas a curcumina manteve desde o início o nível de TNF baixo. Para IL-1 β , apenas a curcumina manteve essa citocina aumentada, as outras drogas e a infecção sozinha não alteraram. A IL-8 estava aumentando desde o início da infecção e as drogas não mudaram os níveis de produção ao longo do período de incubação e tratamento com as drogas.

A via canônica foi ativada pela infecção viral e induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto a via não canônica foi constitutivamente expressa e induziu a produção de uma citocina anti-inflamatória. O equilíbrio entre essas vias pode

determinar o desfecho da infecção pelo vírus Zika nos neuroblastomas e nos monócitos humanos.

Em conclusão, os resultados deste estudo ressaltam a complexidade das respostas celulares e a influência de diferentes condições de tratamento, bem como a distinção entre gestantes e não gestantes. Essas descobertas fornecem informações importantes para entender as interações entre o vírus Zika, as citocinas e as diferentes células, abrindo portas para futuras pesquisas e abordagens terapêuticas potenciais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Meyer, N., O'Mahony L., Palomares O., Rhyner C., Ouaked N., Schaffartzik A., Van De Veen W., Zeller S., Zimmermann M., Akdis C. A. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, 472 functions, and roles in diseases. *Journal Allergy Clin Immunol*, 127, 701-21.
2. Albeni, B. C., Mattson, M. P. (2000). Evidence for the involvement of TNF and NF- κ B in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse*, 35, 151-159.
3. Alves, É. A. R., de Miranda, M. G., Borges, T. K., Magalhães, K. G., Muniz-Junqueira, M. I. (2015). Anti-HIV drugs, lopinavir/ritonavir and atazanavir, modulate innate immune response triggered by Leishmania in macrophages: The role of NF- κ B and PPAR- γ . *International Immunopharmacology*, 24, 314-324.
4. Antoniou, E., Orovou, E., Sarella, A., Iliadou, M., Rigas, N., Palaska, E., Dagla, M. (2020). Zika virus and the risk of developing microcephaly in infants: a systematic review. *International journal of environmental research and public health*, 17, 3806.
5. Barnabei L., Laplantine E., Mbongo W., Rieux-Laucat F., Weil R. (2021). NF- κ B: At the Borders of Autoimmunity and Inflammation. *Frontiers Immunology*. 12,716469.
6. Başka P., Norbury LJ. (2022). The Role of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) in the Immune Response Against Parasites. *Pathogens*. 11, 310.
7. Berthoud, T. K., Dunachie, S. J., Todryk, S., Hill, A. V., Fletcher, H. A. (2009). MIG (CXCL9) is a more sensitive measure than IFN- γ of vaccine induced T-cell responses in volunteers receiving investigated malaria vaccines. *Journal of immunological methods*, 340, 33-41.
8. Best, B. M., Stek, A. M., Mirochnick, M., Hu, C., Li, H., Burchett, S. K., Capparelli, E. V. (2010). Lopinavir tablet pharmacokinetics with an increased dose during pregnancy. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, 54, 381- 388.
9. Bhakar, A. L., Tannis, L. L., Zeindler, C., Russo, M. P., Jobin, C., Park, D. S., Barker, P. A. (2002). Constitutive nuclear factor- κ B activity is required for central neuron survival. *Journal of Neuroscience*, 22, 8466-8475.
10. Brandetti, E., Focaccetti, C., Pezzolo, A., Ognibene, M., Folgiero, V., Cotugno, N., Cifaldi, L. (2021). Enhancement of neuroblastoma NK-Cell-Mediated lysis through NF- κ B p65 subunit-induced expression of FAS and PVR, the loss of which is associated with poor patient outcome. *Cancers*, 13, 4368.

11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico nº 08- 2019- Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 52 de 2018; Vol. 50. <https://www.saude.df.gov.br>). Acesso em 07/08/2023.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico nº 48- 2022- Monitoramento dos casos de arboviroses até a Semana Epidemiológica 51 de 2022; Vol. 53. <https://www.saude.df.gov.br>). Acesso em 07/08/2023.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico ISSN 9352-7864 ©1969. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, 2023. <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVSA-05-2023.pdf> (<https://www.saude.df.gov.br>) . Acesso em 08/08/2023.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Mensal Arboviroses++2022 SE 01 a 26.pdf/d0fbb601-e05c-ed09-60e7-695cd3b9eace?t=1688491855692; Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya, doença aguda pelo vírus zika e febre amarela até a Semana Epidemiológica 26 de 2023, no Distrito Federal. <https://www.saude.df.gov.br/documentos/37101/0/24>. Acesso em 10/08/2023.
15. Brasil. Ministério da Saúde, Fiocruz- Fundação Oswaldo Cruz / Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos). Sulfato de Atazanavir- Bula, 2021 [Internet]. [citado em 23 Fev. 2023]. Disponível em [https://www.far.fiocruz.br/wp-content/uploads/2021/06/Sulfato-de-atazanavir-Bula_Paciente.pdf](https://www.far.fiocruz.br/wp-content/uploads/2021/06/Sulfato-de-atazanavir-Bula-Paciente.pdf). Acesso em 19/08/2023.
16. Bosso M., Thanaraj TA., Abu-Farha M., Alanbaei M., Abubaker J., Al-Mulla F. (2020). The Two Faces of ACE2: The Role of ACE2 Receptor and Its Polymorphisms in Hypertension and COVID-19. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*. 18,321-327.
17. Cardeti G., Mariano V., Eleni C., Aloisi M., Grifoni G., Sittinieri S., Dante G., Antognetti V., Foglia EA., Cersini A., Nardi A. (2016). Encephalomyocarditis virus infection in *Macaca sylvanus* and *Hystrix cristata* from an Italian rescue centre for wild and exotic animals. *Virology Journal*. 13, 193.
18. Chu, W. M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer letters*, 328, 222-225.
19. Corazza, D. (2021). Influência do Atazanavir nas vias inflamatórias em neuroblastos infectados ou não pelo vírus Zika. 158 f., il. *Tese (Doutorado em Medicina Tropical)* — Universidade de Brasília, Brasília, 2021. Disponível em: [Repositório Institucional da UnB].

20. Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L., Guimarães, K. P., Beltrão-Braga, P. C. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534, 267-271.
21. Cvetkovic, R. S., Goa, K. L. (2003). Lopinavir/ritonavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs*, 63, 769-802.
22. Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research*, 29, 313-326.
23. Dorrington MG., Fraser IDC. (2019). NF- κ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Frontiers in Immunology*. 10.
24. Duhén, T., Campbell, D. J. (2014). IL-1 β promotes the differentiation of polyfunctional human CCR6+ CXCR3+ Th1/17 cells that are specific for pathogenic and commensal microbes. *The Journal of Immunology*, 193, 120-129.
25. Duman, R. S., Voleti, B. (2012). Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends in neurosciences*, 35, 47-56.
26. Fernandes MT., Ghezzi MN., Silveira AB., Kalathur RK., Póvoa V., Ribeiro AR., Brandalise SR., Dejardin E., Alves NL., Ghysdael J., Barata JT., Yunes JÁ., dos Santos NR. (2015). Lymphotoxin- β receptor in microenvironmental cells promotes the development of T-cell acute lymphoblastic leukaemia with cortical/mature immunophenotype. *British Journal of Haematology*. 171, 736-51.
27. Förger, F., Villiger, P. M. (2020). Immunological adaptations in pregnancy that modulate rheumatoid arthritis disease activity. *Nature Reviews Rheumatology*, 16, 113-122.
28. Forloni M., Albin S., Limongi MZ., Cifaldi L., Boldrini R., Nicotra MR., Giannini G., Natali PG., Giacomini P., Fruci D. (2010). NF-kappaB, and not MYCN, regulates MHC class I and endoplasmic reticulum aminopeptidases in human neuroblastoma cells. *Cancer Research*. 70, 916-24.
29. Fu Y., Tang L., Hu M., Xiang Z., Hu Y. (2020). Changes of serum interleukin-6 in healthy pregnant women and establishment of relevant reference intervals. *Clinica Chimica Acta*. 502,116-119.
30. Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25, 6680-6684.
31. Gim E., Shim DW., Hwang I., Shin OS., Yu JW. (2019). Zika Virus Impairs Host NLRP3-mediated Inflammasome Activation in an NS3-dependent Manner. *Immune Network*. 19, e40.

32. Giraldo, M. I., Gonzalez-Orozco, M., Rajsbaum, R. (2023). Pathogenesis of Zika Virus Infection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 18, 181-203.
33. Glezer, I., Marcourakis, T., Avellar, M. C. W., Gorenstein, C., Scavone, C. (2000). O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 22, 26-30.
34. Gómez-Chávez F., Correa D., Navarrete-Meneses P., Cancino-Diaz J.C., Cancino-Diaz M.E., Rodríguez-Martínez S. (2021). NF- κ B and Its Regulators During Pregnancy. *Front Immunol*, NA-NA.
35. Harutyunyan S., Neuhauser I., Mayer A., Aichinger M., Szijártó V., Nagy G., Nagy E., Girardi P., Malinoski FJ., Henics T. (2020). Characterization of ShigE_{TEC}, a Novel Live Attenuated Combined Vaccine against Shigellae and ETEC. *Vaccines (Basel)*. 8, 689.
36. Hayden MS., Ghosh S. (2012). NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & Development*. 26, 203-34.
37. Hayden MS., Ghosh S. (2014). Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*. 26, 253-66.
38. Herder, C., Peeters, W., Illig, T., Baumert, J., de Kleijn, D. P., Moll, F. L., Koenig, W. (2011). RANTES/CCL5 and risk for coronary events: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort, Athero-Express and CARDIOGRAM studies. *PloS one*, 6, e25734.
39. Hiscott, J., Kwon, H., Génin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- κ B pathway. *The Journal of clinical investigation*, 107, 143-151.
40. Hoesel B., Schmid J.A. (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*. 12, 86.
41. Idriss, H. T., Naismith, J. H. (2000). TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship (s). *Microscopy research and technique*, 50, 184-195.
42. Jablonska E. (2002). Effect of soluble interleukin-6 receptor alpha and interleukin-6 secreted by polymorphonuclear leukocytes on tumor necrosis factor-alpha expression and its production by peripheral blood mononuclear cells. *Mediators Inflamm*. 11, 325-8.
43. Jagetia, G. C., Aggarwal, B. B. (2007). "Spicing up" of the immune system by curcumin. *Journal of clinical immunology*, 27, 19-35.
44. Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., Yang, S. H. (2021). The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune

- disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 22, 2719.
45. Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C. (2009). NF- κ B in the nervous system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1, a001271.
 46. Kam YW., Leite JÁ., Lum FM., Tan JLL., Lee B., Judice CC., Teixeira DAT., Andreato-Santos R., Vinolo MA., Angerami R., Resende MR., Freitas ARR., Amaral E., Junior RP., Costa ML., Guida JP., Arns CW., Ferreira LCS., Rénia L., Proença-Modena JL., Ng LFP., Costa FTM. (2017). Zika-Unicamp Network. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus-Infected Patients in Brazil. *Journal Infectious Diseases*. 216, 172-181.
 47. Karin M., Ben-Neriah Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual Review of Immunology*. 18, 621-63.
 48. Karin, M., Cao, Y., Greten, F. *et al.* (2002). NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer*. 2, 301–310.
 49. Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii KJ., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh CS., Reis e Sousa C., Matsuura Y., Fujita T., Akira S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 7089,101-5.
 50. Khera T., Todt D., Vercauteren K., McClure CP., Verhoye L., Farhoudi A., Bhujra S., Geffers R., Baumert TF., Steinmann E., Meuleman P., Pietschmann T., Brown RJ. (2017). Tracking HCV protease population diversity during transmission and susceptibility of founder populations to antiviral therapy. *Antiviral Research*. 139,129-137.
 51. Kulms D., Schwarz T. (2006). NF- κ B and Cytokines, Vitamins & Hormones. *Academic Press*. 74, 283-300.
 52. Kung PL., Chou TW., Lindman M., Chang NP., Estevez I., Buckley BD., Atkins C., Daniels BP. (2022). Zika virus-induced TNF- α signaling dysregulates expression of neurologic genes associated with psychiatric disorders. *Journal Neuroinflammation*. 19, 100.
 53. Lawrence T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1, a001651.
 54. Liu J., Zhang M., Kan Y., Wang W., Liu J., Gong J., Yang J. (2021). Nuclear Factor- κ B Activating Protein Plays an Oncogenic Role in Neuroblastoma Tumorigenesis and Recurrence Through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Signaling Pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 8,622793.
 - 55.

56. Liczbiński, P., Michałowicz, J., Bukowska, B. (2020). Molecular mechanism of curcumin action in signaling pathways: Review of the latest research. *Phytotherapy Research*, 34, 1992-2005.
57. Liu, M., Guo, S., Hibbert, J. M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N. O., Stiles, J. K. (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine & growth factor reviews*, 22, 121-130.
58. Luppi, P. (2003). How immune mechanisms are affected by pregnancy. *Vaccine*, 21, 3352-3357.
59. Marín-Rubio, J. L., Vela-Martín, L., Fernández-Piqueras, J., Villa-Morales, M. (2019). FADD in cancer: mechanisms of altered expression and function, and clinical implications. *Cancers*, 11, 1462.
60. Mathes E., O'Dea EL., Hoffmann A., Ghosh G. (2008). NF-kappaB dictates the degradation pathway of IkappaBalpha. *EMBO Journal*. 27, 1357-67.
61. McGuirk J., Waller EK., Qayed M., Abhyankar S., Ericson S., Holman P., Keir C., Myers GD. (2017). Building blocks for institutional preparation of CTL019 delivery. *Cytotherapy*. 19, 1015-1024.
62. Meffert, M. K., Baltimore, D. (2005). Physiological functions for brain NF- κ B. *Trends in neurosciences*, 28, 37-43.
63. Mlacker, S., Shafa, G., Aldahan, A. S., Shah, V. V., Samarkandy, S., Nouri, K. (2016). Origin of the Zika virus revealed: a historical journey across the world. *International journal of dermatology*, 55, 1369-1372.
64. Mounce, B. C., Cesaro, T., Carrau, L., Vallet, T., Vignuzzi, M. (2017). Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. *Antiviral research*, 142, 148-157.
65. Ojha CR., Rodriguez M., Lapierre J., Muthu Karuppan MK., Branscome H., Kashanchi F., El-Hage N. (2018). Complementary Mechanisms Potentially Involved in the Pathology of Zika Virus. *Frontiers Immunology*. 9, 2340.
66. Oldenkamp M., Hagedoorn M., Wittek R., Stolk R., Smidt N. (2017). The impact of older person's frailty on the care-related quality of life of their informal caregiver over time: results from the TOPICS-MDS project. *Quality of Life Research*. 26, 2705-2716.
67. Oliveira NC., Pfrimer IAH. (2019). Análise integrada à biologia de sistemas para avaliação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na infecção por Zika vírus. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 51,132-7.
68. Olmo IG., Carvalho TG., Costa VV., Alves-Silva J., Ferrari CZ., Izidoro-Toledo TC., da Silva JF., Teixeira AL., Souza DG., Marques JT., Teixeira MM., Vieira LB., Ribeiro FM. (2017). Zika Virus Promotes Neuronal Cell Death in a Non-Cell

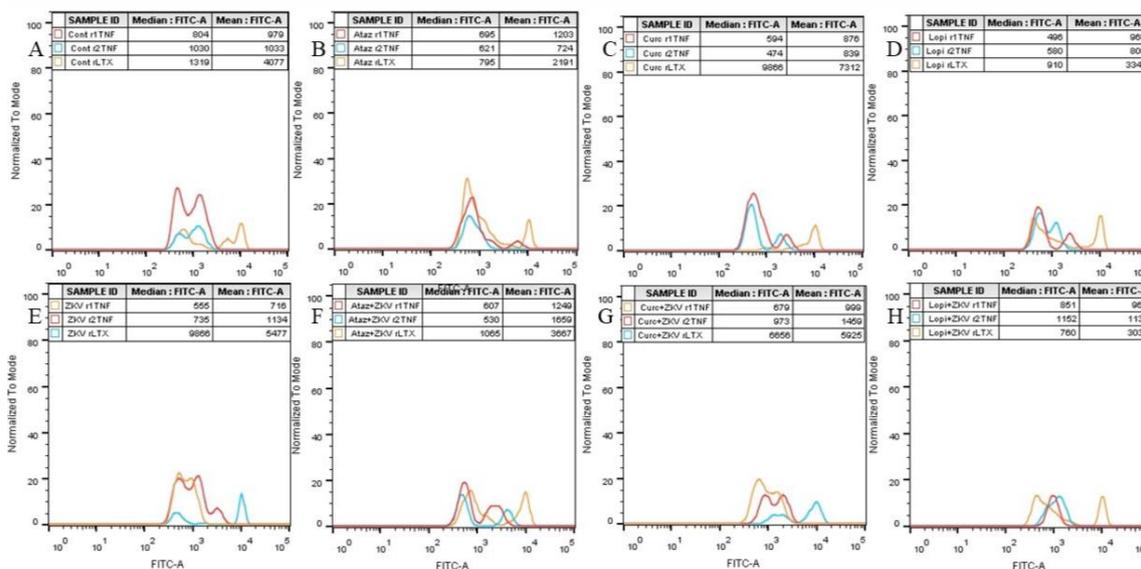
- Autonomous Manner by Triggering the Release of Neurotoxic Factors. *Frontiers Immunology*. 8,1016.
69. Otero, A. M., Antonson, A. M. (2022). At the crux of maternal immune activation: Viruses, microglia, microbes, and IL-17A. *Immunological Reviews*, 311, 205-223.
 70. Paolino BM., Araoz OKV., Wing ACM., Silva ALF. da, Rocco R., Lauria C., Brindeiro R., Bento CAM. (2005). Produção de interleucina-10 na gestação reduz a taxa de replicação do HIV-1 em culturas de linfócitos maternos. *Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia*. 27, 393–400.
 71. Pierson TC., Diamond MS. (2018). The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature*. 560, 573–581.
 72. Piao, W., Kasinath, V., Saxena, V., Lakhan, R., Iyyathurai, J., Bromberg, J. S. (2021). LT β R signaling controls lymphatic migration of immune cells. *Cells*, 10, 747.
 73. Ranjan K., Surolia A., Pathak C. (2012). Apoptotic potential of Fas-associated death domain on regulation of cell death regulatory protein cFLIP and death receptor mediated apoptosis in HEK 293T cells. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 6, 155-68.
 74. Ranjan K., Pathak C. (2016). FADD regulates NF- κ B activation and promotes ubiquitination of cFLIPL to induce apoptosis. *Scientific Reports*. 6, 22787.
 75. Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., Forsthuber, T. G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 74, 5-17.
 76. Sacks, G., Sargent, I., Redman, C. (1999). An innate view of human pregnancy. *Immunology today*, 20, 114-118.
 77. Sarnico, I., Lanzillotta, A., Boroni, F., Benarese, M., Alghisi, M., Schwaninger, M., Pizzi, M. (2009). NF- κ B p50/RelA and c-Rel-containing dimers: opposite regulators of neuron vulnerability to ischaemia. *Journal of neurochemistry*, 108, 475-485.
 78. Schett G., Elewaut D., McInnes IB., Dayer JM., Neurath MF. (2013). How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nature Medicine*. 19, 822-4.
 79. Schett G., Sticherling M., Neurath MF. (2020). COVID-19: risk for cytokine targeting in chronic inflammatory diseases?. *Nature Reviews Immunology*. 20, 271-272.

80. Shih Ruey-Horng., Wang Chen-Yu., Yang Chuen-Mao. (2015). NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 8.
81. Schiela, B., Bernklau, S., Malekshahi, Z., Deutschmann, D., Koske, I., Banki, Z., Stoiber, H. (2018). Active human complement reduces the Zika virus load via formation of the membrane-attack complex. *Frontiers in immunology*, 9, 2177.
82. Schneider, K., Potter, K. G., & Ware, C. F. (2004). Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. *Immunological reviews*, 202, 49-66.
83. Shishodia, S. (2013). Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. *Biofactors*, 39, 37-55.
84. Sun SC. (2012). The noncanonical NF-κB pathway. *Immunological Reviews*. 246, 125-40.
85. Sun, S. C. (2017). The non-canonical NF-κB pathway in immunity and inflammation. *Nature reviews immunology*, 17, 545-558.
86. Tappe D., Pérez-Girón JV., Zammarchi L., Rissland J., Ferreira DF., Jaenisch T., Gómez-Medina S., Günther S., Bartoloni A., Muñoz-Fontela C., Schmidt-Chanasit J. (2016). Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Medical Microbiology and Immunology*. 205, 269-73.
87. Thorburn, J., Moore, F., Rao, A., Barclay, W. W., Thomas, L. R., Grant, K. W., Thorburn, A. (2005). Selective inactivation of a Fas-associated death domain protein (FADD)-dependent apoptosis and autophagy pathway in immortal epithelial cells. *Molecular biology of the cell*, 16, 1189-1199.
88. Toksoy A., Sennefelder H., Adam C., Hofmann S., Trautmann A., Goebeler M., Schmidt M. 2017. Potent NLRP3 Inflammasome Activation by the HIV Reverse Transcriptase Inhibitor Abacavir. *Journal of Biological Chemistry*. 292, 2805-2814.
89. Tiec, C. L., Barrail, A., Goujard, C., Taburet, A. M. (2005). Clinical pharmacokinetics and summary of efficacy and tolerability of atazanavir. *Clinical pharmacokinetics*, 44, 1035-1050.
90. Toder, V., Fein, A., Carp, H., & Torchinsky, A. (2003). TNF-α in pregnancy loss and embryo maldevelopment: a mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetoplacental unit?. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 20, 73-81.
91. True, H., Blanton, M., Sureshchandra, S., Messaoudi, I. (2022). Monocytes and macrophages in pregnancy: The good, the bad, and the ugly. *Immunological Reviews*, 308, 77-92.

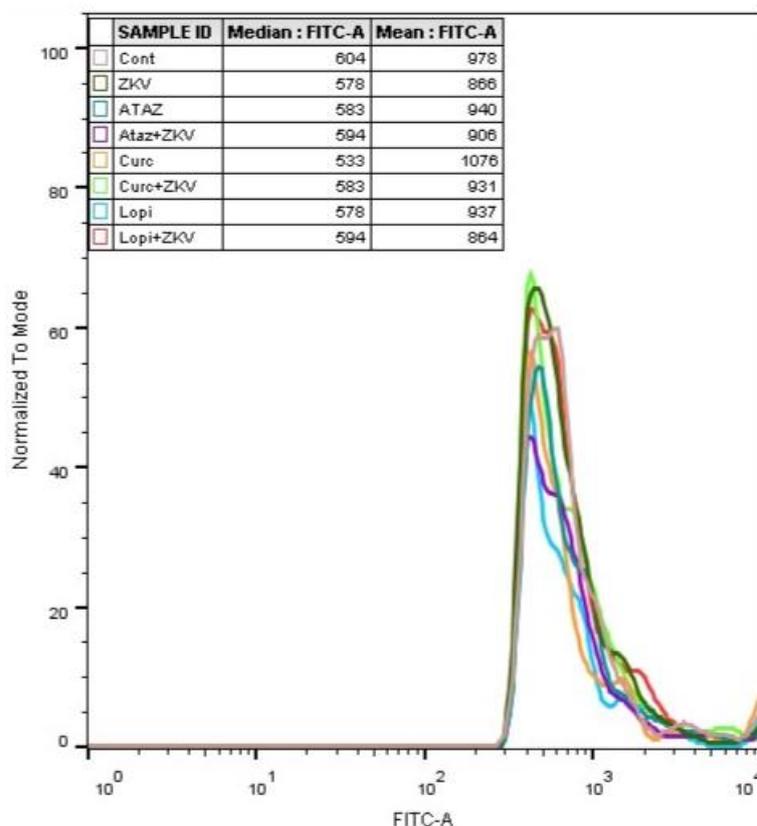
92. Tsai, Y. M., Chien, C. F., Lin, L. C., Tsai, T. H. (2011). Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood–brain barrier penetration. *International journal of pharmaceutics*, 416, 331-338.
93. Tsoli M, Boutzios G, Kaltsas G. Immune System Effects on the Endocrine System. [Updated 2019 Nov 16]. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279139/>
94. Uzunova, K., Filipova, E., Pavlova, V., Vekov, T. (2020). Insights into antiviral mechanisms of remdesivir, lopinavir/ritonavir and chloroquine/hydroxychloroquine affecting the new SARS-CoV-2. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110668.
95. Vallabhapurapu S., Karin M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology*. 27, 693-733.
96. van Loo, G., & Bertrand, M. J. (2023). Death by TNF: a road to inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 23, 289-303.
97. Wang H., Schuetz C., Arima A., Chihaya Y., Weinbauer GF., Habermann G., Xiao J., Woods C., Grogan J., Gelzleichter T., Cain G. (2016). Assessment of placental transfer and the effect on embryo-fetal development of a humanized monoclonal antibody targeting lymphotoxin-alpha in non-human primates. *Reproductive Toxicology*. 63, 82-95.
98. Ware, C. F. (2005). Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 787-819.
99. Weaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco, M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G. S., Saade, G., Vasilakis, N. (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral research*, 130, 69-80.
100. Wen, Z., Song, H., Ming, G. L. (2017). How does Zika virus cause microcephaly?. *Genes & development*, 31, 849-861.
101. Wu, C., Wu, X., Xia, J. (2020). Hepatitis E virus infection during pregnancy. *Virology Journal*, 17, 1-11.
102. Yang HJ., Wang M., Wang L., Cheng BF., Lin XY., Feng ZW. (2015). NF-κB regulates caspase-4 expression and sensitizes neuroblastoma cells to Fas-induced apoptosis. *PLoS One*. 10, e0117953.
103. Xiao, X., Putatunda, R., Zhang, Y., Soni, P. V., Li, F., Zhang, T., Hu, W. (2018). Lymphotoxin β receptor-mediated NFκB signaling promotes glial lineage differentiation and inhibits neuronal lineage differentiation in mouse brain neural stem/progenitor cells. *Journal of Neuroinflammation*, 15, 1-14.

104. Zanotto-Filho, A., Braganhol, E., Klafke, K., Figueiró, F., Terra, S. R., Paludo, F. J., Moreira, J. C. F. (2015). Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas. *Cancer letters*, 358, 220-231.
105. Zhang X., Liu C., Cao Y., Liu L., Sun F., Hou L. (2022). RRS1 knockdown inhibits the proliferation of neuroblastoma cell via PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Pediatric Research*. NA/NA

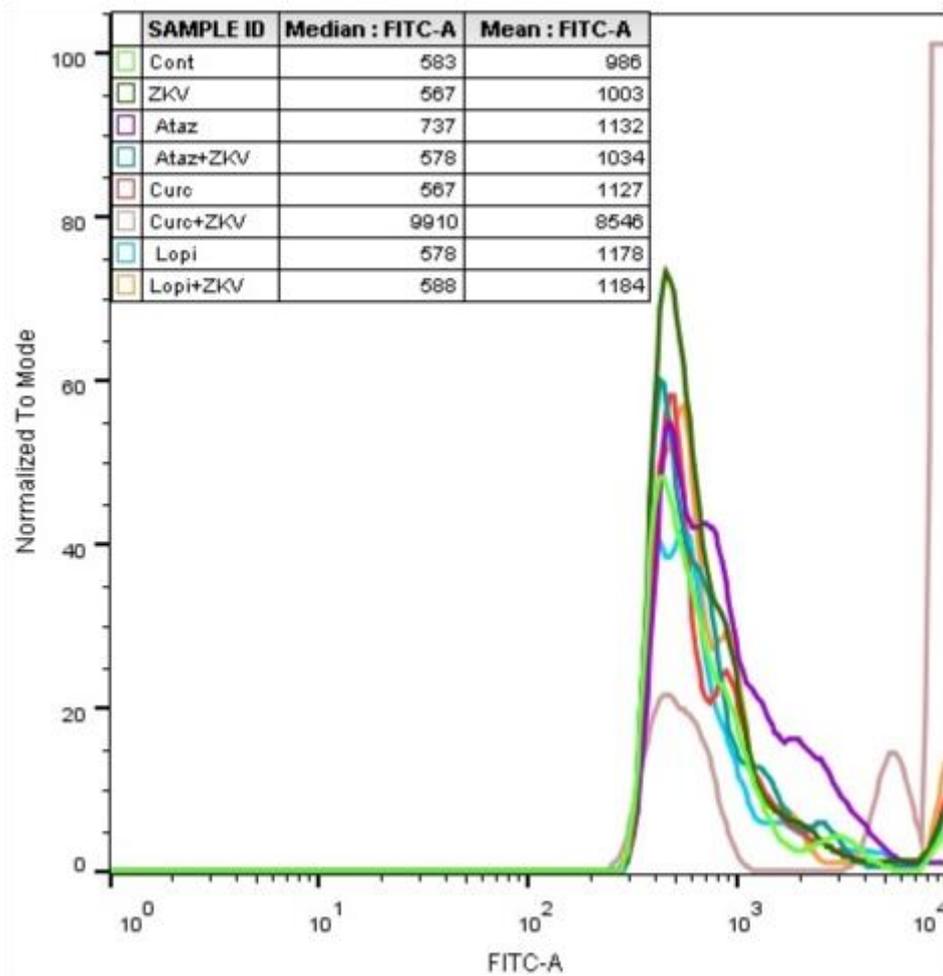
8 ANEXOS



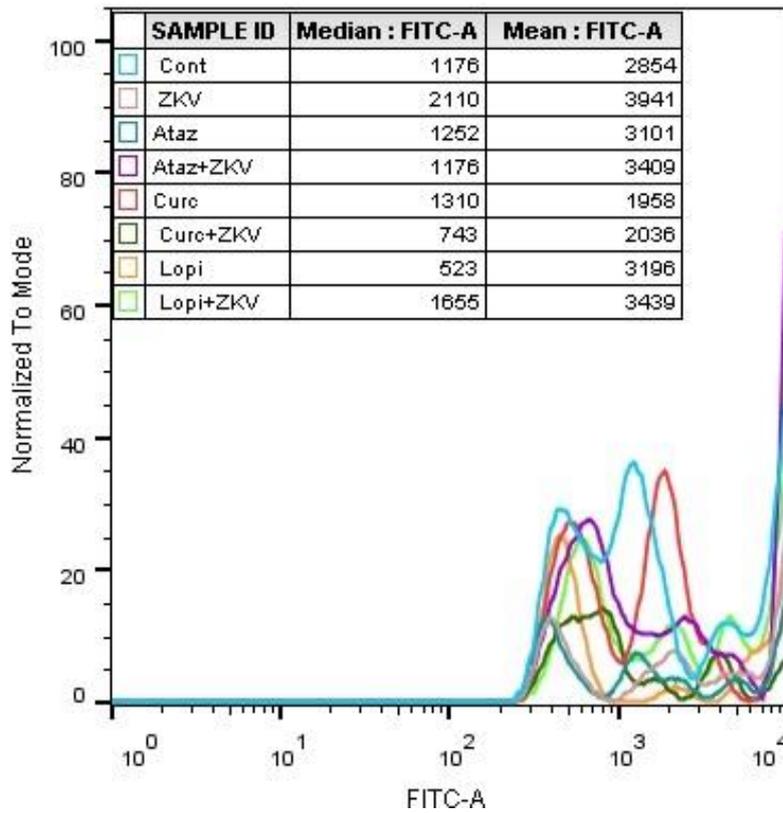
Anexo 1- Imagem representativa do histograma da avaliação da incubação de neuroblastoma com vírus Zika e do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir pela intensidade de fluorescência média dos receptores para o TNF (r1TNF, r2TNF e rLTX), avaliado por citometria de fluxo. A=controle, B=atazanavir, C=curcumina, D=Lopinavir, E=Zika, F=Zika+atz, G=Zika+Curc, H=Zika+lopi.



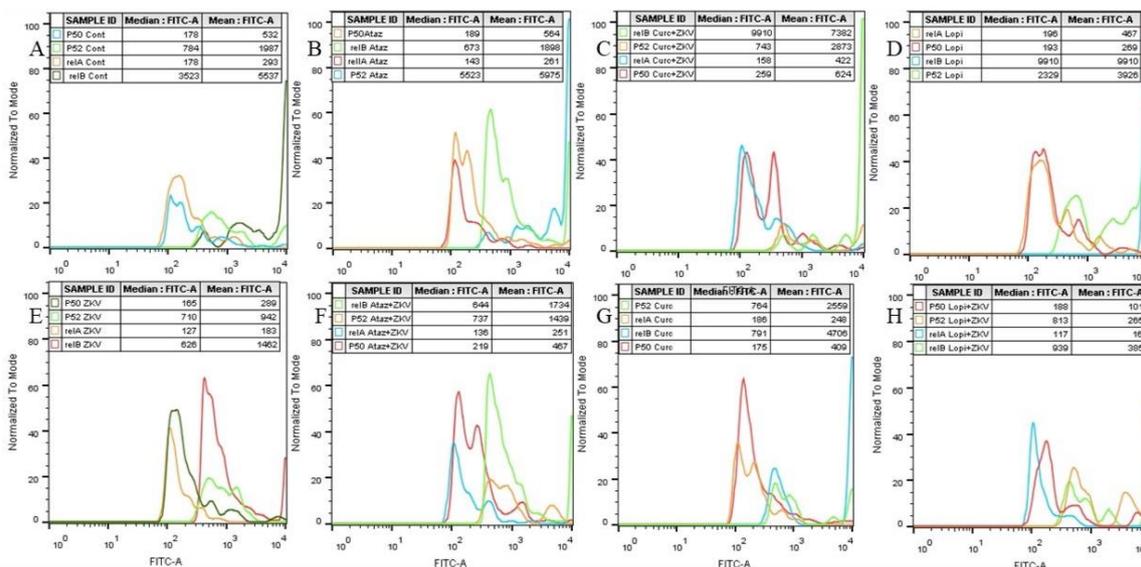
Anexo 2- Imagem representativa do histograma da avaliação da incubação de neuroblastoma com vírus Zika e do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na intensidade de fluorescência média da molécula FADD, avaliado por citometria de fluxo.



Anexo 3- Imagem representativa do histograma da avaliação da incubação de neuroblastoma com vírus Zika e do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na intensidade de fluorescência média na molécula NIK do NF- κ B, avaliado por citometria de fluxo.



Anexo 4- Imagem representativo do histograma da avaliação da incubação de neuroblastoma com vírus Zika e do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na intensidade de fluorescência média da molécula IκB, avaliado por citometria de fluxo.



Anexo 5- Imagem representativa do histograma da avaliação da incubação de neuroblastoma com vírus Zika e do tratamento com atazanavir, curcumina e lopinavir na intensidade de fluorescência média nas moléculas p50, p52, p65 reIA e reIB do NFκB avaliado por citometria de fluxo

Anexo 6 -Parecer do Comitê de Ética.

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito de drogas moduladoras das vias do NFkappaB envolvidas na ativação, proliferação ou morte celular na infecção pelo Vírus Zika

Pesquisador: Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61278316.4.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.793.796

Apresentação do Projeto:

O presente projeto terá duas abordagens: 1) esclarecer quais vias de ativação do NF-kB que culminam em apoptose, proliferação ou inflamação são desencadeadas em monócitos humanos de pacientes gestantes infectadas com o vírus Zika e em linhagem celular de neurônio humano infectado in vitro com o vírus Zika. 2) esclarecer se as drogas ritonavir/lopinavir, atazanavir e curcumin modificam a escolha das vias do NF-kB durante a infecção com vírus Zika e se as alterações determinadas poderiam diminuir a apoptose e a proliferação viral. Serão estudadas gestantes no início da infecção com o vírus e as vias de ativação do NFB e a produção de citocinas e radicais livres serão avaliados em células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com a infecção pelo vírus Zika. Os mesmos parâmetros serão estudados também em linhagem de célula neuronal. Serão rastreadas por citometria de fluxo e/ou microscopia confocal a expressão das moléculas de ativação das vias do NFB, desde o receptor para o FNT que é estimulado, quais as moléculas adaptadoras que são ativadas, e quais as vias que são desencadeadas. Espera-se esclarecer os mecanismos que potencialmente desencadeiam a apoptose neuronal e que poderiam culminar em microcefalia e verificar se as drogas moduladoras das vias do NFB, ritonavir/lopinavir, atazanavir e curcumina poderiam potencialmente diminuir as lesões determinadas pelo vírus.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900

UF: DF **Município:** BRASILIA

Telefone: (61)3107-1918

E-mail: fmd@unb.br

Continuação do Parecer: 1.793.796

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar em linhagens de células neuronais e em monócitos de pacientes com a infecção pelo vírus Zika quais as vias de ativação do NFB que são desencadeadas que poderiam culminar em morte celular por apoptose, proliferação ou resposta inflamatória.

avaliar in vitro o efeito de drogas moduladoras da ativação das vias do NFkB, ritonavir/lopinavir, atazanavir e curcumina, com potencial para diminuir as complicações da infecção por esse vírus. O presente projeto terá duas abordagens: 1) esclarecer quais vias de ativação do NF-kB que culminam em apoptose, proliferação ou inflamação são desencadeadas em monócitos humanos de pacientes gestantes infectadas com o vírus Zika e em linhagem celular de neurônio humano infectado in vitro com o vírus Zika. 2) esclarecer se as drogas ritonavir/lopinavir, atazanavir e curcumin modificam a escolha das vias do NF-kB durante a infecção com vírus Zika e se as alterações determinadas poderiam diminuir a apoptose e a proliferação viral. Pretende-se ainda, esclarecer os mecanismos que potencialmente desencadeiam a apoptose neuronal e que poderiam culminar em microcefalia e verificar se as drogas moduladoras das vias do NFB, ritonavir/lopinavir, atazanavir e curcumina poderiam potencialmente diminuir as lesões determinadas pelo vírus.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos estão relacionados ao desconforto da coleta de sangue ocasionado uma pequena vermelhidão no local onde for coletado o sangue e que depois pode ficar roxo no local, e que desaparecerá em alguns dias. Os benefícios serão enormes caso se estabeleça drogas e medidas terapêuticas e ações preventivas para o desenvolvimento da microcefalia em gestantes infectadas pelo Zika vírus.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante porque entre outros fatores oferece a possibilidade de utilizar os antirretrovirais, que já são normalmente utilizados em gestantes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Se essas drogas se mostrarem efetivas poderão ter um grande impacto na saúde da população do DF, tanto impacto social por diminuir o agravo pela doença, impacto econômico, pela possibilidade de diminuir a carga de doença, caso essas drogas tenham capacidade de diminuir a replicação viral, e na sua mais grave complicação, que é a microcefalia, e, pela possibilidade de diminuir os gastos com a fase aguda da doença e em longo prazo, pela possibilidade de diminuição dos custos para o acompanhamento das crianças que nascerem com a microcefalia.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

Continuação do Parecer: 1.793.796

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto encontra-se bem estruturado com TCLE, critérios de inclusão e exclusão, riscos e benefícios bem estabelecidos.

Recomendações:

Considerando que a pesquisa encontra-se de acordo com a resolução do CNS/Conep 466/12 o parecer, salvo melhor juízo do colegiado, é pela aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto foi apresentado na 9ª Reunião Ordinária do CEP-FM.

Após discussão do parecer emitido pelo relator(a), o projeto foi aprovado por unanimidade.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_812541.pdf	24/10/2016 09:45:17		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	24/10/2016 09:43:25	Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira	Aceito
Outros	RESUMO.pdf	22/10/2016 14:09:07	Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira	Aceito
Outros	Termo_de_concordancia.pdf	22/10/2016 14:07:46	Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira	Aceito
Outros	termo_de_ciencia.pdf	22/10/2016 14:07:23	Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira	Aceito
Outros	declaracao_de_responsabilidade.pdf	22/10/2016 14:06:34	Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira	Aceito
Outros	carta_de_encaminhamento.pdf	22/10/2016 14:05:19	Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira	Aceito
Outros	Curriculo_Isabella.pdf	22/10/2016 14:04:24	Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira	Aceito
Outros	Curriculo_Mariangela.pdf	22/10/2016 14:03:57	Maria Imaculada Muniz Barboza	Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br