



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina - FM

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

**Investigação da Resposta Inflamatória durante a Patogênese do vírus Zika: Da
Interface Materno-Fetal à Neuroinflamação**

Heloísa Antoniella Braz de Melo

Orientadora

Profª. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília – DF

Agosto/2025



Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina - FM

Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Investigação da Resposta Inflamatória durante a Patogênese do vírus Zika: Da Interface Materno-Fetal à Neuroinflamação

Aluna: Heloísa Antoniella Braz de Melo

Tese de Doutorado desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília – DF

Agosto/2025

827i

Braz de Melo, Heloisa Antoniella
Investigação da Resposta Inflamatória durante a
Patogênese do vírus Zika: Da Interface Materno-Fetal à
Neuroinflamação / Heloisa Antoniella Braz de Melo;
orientador Kelly Magalhães. Brasília, 2025.

130 p.

Tese (Doutorado em Patologia Molecular) Universidade de
Brasília, 2025.

1. Materno-fetal. 2. Neurodesenvolvimento. 3.
Neuroinflamação. 4. ZIKV. 5. transmissão vertical. I.
Magalhães, Kelly , orient. II. Título.

Nome: Heloísa Antoniella Braz de Melo

Título: Investigação da Resposta Inflamatória durante a Patogênese do vírus Zika: Da Interface Materno-Fetal à Neuroinflamação

Banca examinadora

Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Rafael Rezende Machado

Harvard Medical School

Profa. Dra. Izabela Marques Dourado Basto Charneau

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca

Universidade de Goiás

Prof. Dr. Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares

Universidade de Brasília

Dedico aos meus pais Quézia e Jarmes.

Dedico ao meu irmão João Luiz.

Dedico à minha avó Maria.

Por fim, dedico a todas as pessoas que amam, que me deram forças, suporte e razão para ser uma pessoa melhor a cada dia.

Agradecimentos

A Deus por ter iluminado o meu caminho e ter sido a minha força todos os dias durante a jornada mais difícil que vivi em toda a minha vida.

A minha amiga e orientadora Kelly Grace Magalhães por ter me ensinado os primeiros passos em como ser cientista, como trabalhar com ética, respeito e, o mais importante, com amor. Vou levar os seus ensinamentos comigo todos os dias e espero poder honrar toda a confiança que teve em meu trabalho, pois foram 8 anos de muita troca, aprendizado e amizade.

Ao meu orientador do doutorado sanduíche Jun R Huh que me permitiu aprender sobre a área de pesquisa que quero seguir ao longo da vida, e por ter me orientado tão bem durante um período crucial de desenvolvimento da minha tese. A disciplina que desenvolvi trabalhando com você são traços importantes de quem eu sou profissionalmente hoje. Agradeço também à Shanshan Zhang e Ines Zalosnik por terem me ensinado tanto sobre materno-fetal. Não teriam pessoas mais qualificadas para essa missão ser atribuída e meu trabalho foi fruto de tudo que aprendi com vocês.

Aos meus grandes amigos do laboratório que fizeram essa trajetória mais leve e feliz, em especial à Sabrina Azevedo, Fernanda Lago, Gabriel Pasquarelli, Gabriel Ribeiro, Igor de Oliveira, Felipe Diego, Sarah Pinho, Julia Perin, Nathalia Lago, Ramon Buson, Marina Minari e Clarissa Portarcio. Agradeço também aos meus queridos colegas do LIMI: Isabela Rabello, Rafaela Alves, Laís Bezerra, Nicolas Sá e Maria Heloísa. Agradeço imensamente aos amigos e ex-integrantes do LIMI que me ensinaram todos os primeiros passos no laboratório, em especial à Raquel das Neves, Rafael Corrêa e Lívia Pimentel. Agradeço aos meus queridos e amados amigos Luís Henrique Corrêa, Tiago Furquim e Gabriella Heyn, por todos os ensinamentos e pela amizade verdadeira ao longo desses anos.

Aos meus amigos que conheci nos Estados Unidos: Marília Garcia, Verônica Freire, Hyeyoon Shin, Abul Ariza e Kevin Ariza, que foram a minha família nesse período fora do Brasil. Serei eternamente grata por ter conhecido pessoas tão especiais. Aos meus amigos que conheci no Uruguai: Anna Fernanda, Renato Kaylan, e Nathan Cardore, que ocuparão sempre um lugar muito especial no meu coração.

Às minhas amigas de infância: Michelly Santos, Gabriela Rezende, Bruna Nathany e Adrieny Lopes. Tive a honra de crescer com vocês e agradeço por permanecerem ao meu lado mesmo com a minha distância física. Aos meus amigos da graduação: Alessandro Zanard, Ana Carolina Orlandi, Giovanna Gobbo, Isis Avon, Jade Ribeiro, Flávio de Oliveira e Gabriel Freire. Vocês fazem parte de um dos capítulos mais lindos e especiais da minha vida.

À minha família, em especial minha mãe Quézia, meu pai Jarmes e meu irmão João Luiz. Se vocês não tivessem vivido esse sonho comigo, nada disso seria possível. Obrigada por tornarem a nossa conquista possível, por me ensinarem sobre amor todos os dias e por serem o maior exemplo que eu poderia ter desde o berço. Sem vocês, eu nada seria. Agradeço também aos meus familiares que sempre me apoiaram e estiveram comigo nos momentos mais importantes da minha vida, em especial às minhas avós Maria e Conceição, Tia Simone, Tio Raimundo, Tio Waley, Bianca Kally (e nosso bebê Marco Antônio) e Mikaely Mysla. Aos amigos que são considerados parte da minha família: Walisson Klisman e Rodrigo Lara, por todo carinho, apoio e amor.

Ao Hugo, uma das pessoas mais importantes que conheci durante o meu doutorado sanduíche, e que, desde então, me ensina todos os dias sobre amor, gentileza e companheirismo. Você faz parte dessa conquista.

Aos meus colaboradores: Prof. Dr. Thomas Williams, Prof. Dr. Bergmann Ribeiro, Profa. Dra. Sônia Báó, Profa. Dra. Paula Bellozi, Profa. Dra. Andreza Fabro de Bem, ao *Flow Cytometry Core* e *Microscopy Resources on the North Quad* da Harvard Medical School. Agradeço imensamente ao técnico Chiquinho da Universidade de Brasília e ao querido técnico da *Animal Facility*, Ale Baba, da Harvard Medical School.

À Universidade de Brasília (UnB) por ter sido a minha casa há 10 anos, me proporcionando a experiência de graduação, mestrado e doutorado, com profissionais de excelência da área. Agradeço aos servidores da secretaria da Patologia Molecular e ao coordenador do programa Prof. Dr. Sebastien Charneau, por se disponibilizar sempre em auxiliar os alunos, com muito respeito e dedicação.

Ao Programa Fulbright Brasil por ter me permitido fazer o doutorado sanduíche na universidade dos meus sonhos: Harvard Medical School. Agradeço pelo financiamento, confiança e todo o cuidado e suporte dado aos alunos bolsistas. Agradeço à Carolina Martins e

à Lisa Mervosh, que cuidaram de todo o nosso processo burocrático com muito carinho. E agradeço imensamente aos amigos que fiz através do programa.

Por fim, agradeço às agências de fomento CAPES, FAPDF, Fulbright e, em especial, ao CNPq, por todo o auxílio financeiro prestado ao longo desses anos.

Resumo

Durante o surto de vírus Zika (ZIKV) de 2015-2016, uma correlação positiva entre o ZIKV e defeitos congênitos classificou-o como uma infecção TORCH, representando uma ameaça significativa para gestantes e seus bebês. Apesar dos avanços ao longo desses dez anos desde a epidemia, o entendimento mecanicista de como a infecção por ZIKV influencia a barreira placentária, um tecido crucial que separa o feto em desenvolvimento do compartimento materno, ainda é amplamente necessário. Um dos principais desafios tem sido o uso de modelos experimentais imunocompetentes adequados, que permitam distinguir entre os efeitos causados pela inflamação materna induzida pelo ZIKV, ou seja, quando a resposta inflamatória da mãe impacta indiretamente o feto, daqueles decorrentes da infecção direta dos tecidos fetais pelo vírus. Além disso, ainda é necessário o melhor entendimento de como o ZIKV impacta algumas células cruciais na regulação da neuroinflamação no sistema nervoso central, como a micróglia. Diante disto, essa tese foi dividida em dois capítulos. O capítulo I tem como objetivo: aplicar um modelo experimental adequado para fornecer evidências de que a inflamação materna contribui para a patogênese do ZIKV nos descendentes, incluindo alterações imunológicas e comportamentais; desvendar esses mecanismos pode contribuir para a compreensão dos impactos duradouros da exposição ao ZIKV durante a gestação, ampliando o conhecimento sobre suas consequências para o desenvolvimento fetal que extrapolem a Síndrome Congênita do Zika (SCZ). Ao cruzar fêmeas WT (resistentes ao ZIKV) com machos hSTAT2 *knock-in* (KI), sendo este um genótipo suscetível à infecção, foram gerados descendentes expressando a proteína hSTAT2 em tecidos de origem fetal, incluindo a placenta, mas não nas mães, criando assim descendentes suscetíveis ao ZIKV em um ambiente materno resistente. Em contraste, fêmeas heterozigotas hSTAT2 KI, suscetíveis ao ZIKV, foram cruzadas com machos WT, permitindo gerar descendentes expressando hSTAT2 KI e WT dentro da mesma fêmea grávida, todos gerados em um ambiente materno suscetível ao ZIKV. As fêmeas grávidas foram infectadas no dia embrionário 10.5 (E10.5) e os tecidos foram coletados no dia E17.5. Foi constatado que a carga viral nas placentas de mães resistentes e suscetíveis era comparável, mas fetos derivados de mães suscetíveis apresentaram maior expressão de marcadores inflamatórios na placenta e aumento na porcentagem de células CD11c⁺MHC-II⁺, bem como linfócitos T CD8⁺. O efeito foi mais pronunciado na prole fêmea em comparação a de machos, as quais apresentaram maior porcentagem de células NK1.1⁺ e linfócitos T CD8⁺. Curiosamente, a prole fêmea também apresenta maior expressão de AXL e diminuição da expressão do receptor do interferon tipo-III na placenta, o que pode contribuir para a sua maior

suscetibilidade. Após o nascimento, as fêmeas demonstraram alteração comportamental através do aumento de vocalizações, mantiveram a expressão mais elevada de citocinas e, quatro semanas após o nascimento, as fêmeas exibiram maior porcentagem de linfócitos T CD8⁺ efetores no baço, indicando efeitos imunológicos a longo prazo. Em conjunto, esta tese contribui para o entendimento de que a inflamação materna e a suscetibilidade específica por sexo possam ser importantes componentes para o entendimento da patogênese do ZIKV, com implicações a longo prazo para a saúde dos indivíduos expostos durante a gestação. Os dados reportados reforçam a necessidade de acompanhamento de crianças expostas à infecção congênita e ampliam o alerta para investigar se essa exposição pode estar associada a impactos no neurodesenvolvimento dos descendentes, mesmo na ausência de sinais clínicos clássicos da Síndrome Congênita do Zika.

Já o capítulo II tem como objetivo: investigar o impacto da infecção da micróglia humana pelo ZIKV, verificando também as alterações metabólicas induzida por este vírus neste modelo celular *in vitro*. Para isso, foi utilizada a linhagem celular microglial humana (C20) para a avaliação da ativação celular, inflamatória e metabólica induzida pelo ZIKV nesta célula, *in vitro*. Observou-se que, ao contrário de neurônios e astrócitos, o ZIKV aumentou a capacidade respiratória mitocondrial de micróglia, sustentando a viabilidade e ativação celular de forma prolongada. A diminuição observada nos níveis de glicose, acompanhada pelo acúmulo de intermediários do ciclo do ácido cítrico, é um padrão geralmente associado a uma respiração glicolítica elevada. No entanto, a fosforilação oxidativa permaneceu funcional, e o consumo de glutamato observado sugere uma mudança metabólica que apoia as demandas celulares em resposta à infecção, mantendo a eficiência energética. No Capítulo II, demonstramos que a infecção por ZIKV induz uma reprogramação metabólica em micróglia, permitindo sua ativação inflamatória e manutenção da viabilidade durante a replicação viral. Esses resultados evidenciam o papel dual dessas células na patogênese do ZIKV, atuando simultaneamente como mediadoras de neuroinflamação e reservatório viral, com potenciais impactos duradouros na saúde dos indivíduos expostos.

Abstract

During the 2015–2016 Zika virus (ZIKV) outbreak, a positive correlation between ZIKV infection and congenital malformations led to its classification as a TORCH infection, posing a significant threat to pregnant women and their babies. Despite scientific advances over the past decade, a deeper mechanistic understanding of how ZIKV infection impacts the placental barrier, a crucial tissue separating the developing fetus from the maternal compartment, remains necessary. One of the ongoing challenges has been the development of suitable immunocompetent experimental models capable of distinguishing between maternal inflammation induced by ZIKV and the virus's direct effects on the offspring. Besides, a better understanding of how ZIKV impacts the key cells related to neuroinflammation in the central nervous system (CNS), such as microglia, is still necessary. Considering these aspects, the current thesis was developed in two chapters. The aim of Chapter 1 is to apply an appropriate experimental model to prove that maternal inflammation triggered by ZIKV contributes to immunological and behavioral alterations in offspring. Elucidating these mechanisms may deepen our understanding of the long-lasting consequences of ZIKV exposure during gestation, expanding the current knowledge beyond Congenital Zika Syndrome (CZS). To study these effects, wild-type (WT) females, resistant to ZIKV, were mated with hSTAT2 knock-in (KI) males, whose genotype is susceptible to infection. This generated offspring expressing human STAT2 in fetal-derived tissues, including the placenta, but not in the mother, thus creating ZIKV-susceptible fetuses within a ZIKV-resistant maternal environment. Conversely, hSTAT2 KI heterozygous females (susceptible to ZIKV) were mated with WT males, resulting in both hSTAT2 KI and WT offspring developing within the same pregnant dam, this time in a ZIKV-susceptible maternal environment. Pregnant females were infected on embryonic day 10.5 (E10.5), and tissues were harvested at E17.5. Viral load in the placentas of both resistant and susceptible mothers was comparable. However, fetuses from susceptible mothers demonstrated a higher expression of inflammatory markers in the placenta, along with an increased percentage of CD11c⁺MHC-II⁺ cells and CD8⁺ T lymphocytes. The effects were more pronounced in female offspring, showing a greater proportion of NK1.1⁺ cells and CD8⁺ T cells. Interestingly, female offspring also exhibited increased expression of AXL and decreased expression of the type III interferon receptor in the placenta, which may contribute to their heightened susceptibility. After birth, female offspring demonstrated behavioral changes characterized by an increase in vocalizations and exhibited elevated cytokine expression in the brain. 4 weeks post-birth, females had a higher percentage of effector CD8⁺ T cells in the

spleen, indicating long-term immune alterations. Taken together, we propose that maternal inflammation and sex-specific susceptibility may be key components in understanding ZIKV pathogenesis, with long-term implications for the health of individuals exposed during gestation, even in the absence of the classical clinical signs of Congenital Zika Syndrome. The findings support the need for continued monitoring of children exposed to congenital infection and highlight the importance of investigating whether such exposure may be associated with neurodevelopmental impacts in the offspring.

In chapter 2, the aim is to investigate the impact of human microglial infection with ZIKV, focusing on metabolic alterations induced by this virus *in vitro*. To achieve this, the human microglial cell line (C20) was infected with ZIKV, and cellular activation parameters, mitochondrial dynamics, and metabolism were evaluated throughout the infection. It was found that, in contrast to neurons and astrocytes, ZIKV infection increased mitochondrial respiratory capacity in microglia, supporting prolonged cell viability and activation. Observed reductions in glucose levels and accumulation of tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates are typically associated with enhanced glycolytic respiration. However, oxidative phosphorylation remained functional, and the consumption of glutamate indicates a metabolic adaptation that meets cellular demands during infection while preserving energy efficiency. In Chapter II, we demonstrate that ZIKV infection induces metabolic reprogramming in microglial cells, enabling both inflammatory activation and the maintenance of cell viability during viral replication. These results demonstrate the dual role of microglia in ZIKV pathogenesis, acting simultaneously as mediators of neuroinflammation and as viral reservoirs, with potential long-lasting consequences for exposed individuals.

Sumário

Resumo	9
Abstract.....	11
Sumário	13
Índice de figuras	16
Introdução Geral.....	18
Vírus Zika: Aspectos epidemiológicos, moleculares e tropismo celular	18
Capítulo 1: Investigação da contribuição da resposta imune materna para a patogênese do ZIKV nos descendentes	24
1.2 Interface materno-fetal e a transmissão vertical.....	24
1.3 Ativação do sistema imune materno e transtornos do neurodesenvolvimento .	30
1.4 Aplicação de um modelo imunocompetente para estudar a influência da resposta imune materna na patogênese do ZIKV	35
2. Justificativa.....	38
3. Objetivos.....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. Metodologia	39
4.1 Acondicionamento e manejo dos animais	39
4.2. Experimentação <i>in vivo</i>	40
4.2.1 Delineamento para obtenção do modelo experimental proposto.....	40
4.2.2 Infecção de camundongos durante a gestação e coleta de tecidos	41
4.2.3 Coleta de sangue.....	42
4.2.4 Extração de RNA de soro e tecido e qPCR	42
4.3.5 Quantificação	43
4.3.6 Isolamento de células imunes dos tecidos	44
4.2.7 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	44
4.2.8 Ensaio de vocalizações ultrassônicas	47
4.3 Análises estatísticas	48
5. Resultados	49
5.1 Resposta imune diferencial de fêmeas grávidas infectadas com ZIKV	49
5.2. Aumento da inflamação em placentas de camundongos hSTAT2KI de mães suscetíveis.....	53

5.3.	Aumento de marcadores inflamatórios na placenta de fetos fêmeas expostos ao ZIKV durante a gestação	59
5.4.	O efeito da exposição ao ZIKV no líquido amniótico durante a gestação	63
5.5.	Efeitos da exposição pré-natal ao ZIKV no cérebro fetal, no pós-nascimento e nas células imunes do baço da prole	64
5.6.	Alteração comportamental em prole fêmea após exposição ao ZIKV durante a gestação	70
5.7.	Expressão diferencial do receptor de entrada viral na placenta	71
5.8.	Alterações a curto e longo prazo na prole fêmea hSTAT2KI após exposição ao ZIKV durante a gestação	72
6.	<i>Discussão</i>	75
	<i>Conclusão e perspectivas – Capítulo 1</i>	80
	<i>Capítulo 2: Avaliação das alterações metabólicas e dinâmica mitocondrial em micróglia infectadas pelo ZIKV: implicações para a neuroinflamação</i>	82
1.	<i>Introdução</i>	82
1.1	A micróglia como um alvo metabólico durante a neuroinflamação	82
2.	<i>Justificativa</i>	87
3.	<i>Objetivos</i>	87
4.	<i>Metodologia</i>	88
4.1	Linhagem de célula microglial e infecção <i>in vitro</i>	88
4.9	Análises estatísticas	92
5.	<i>Resultados</i>	92
5.1.	Micróglia infectadas pelo ZIKV apresentam translocação de NF- κ B para o núcleo e alterações morfológicas associadas à reorganização de β -tubulina	92
5.2	Deteção do ZIKV na micróglia por RT-qPCR e microscopia eletrônica de transmissão	95
5.3	Investigação da dinâmica mitocondrial em resposta à infecção pelo ZIKV em micróglia	96
5.4	Investigação das adaptações metabólicas após a exposição ao ZIKV em células microgliais	98
6.	<i>Discussão</i>	100
7.	<i>Conclusões e perspectivas</i>	103
	<i>Produções acadêmicas durante o doutorado</i>	105
	<i>Referências Bibliográficas</i>	111

Lista de abreviações

APCs – *Antigen presenting cells*

DCs – Células dendríticas

IFN-I – Interferon do Tipo I

IFN-III – Interferon do Tipo III

ISGs – Genes induzidos por IFN

hSTAT2KI – STAT2 humana *knock-in*

MIA – *Maternal Immune Activation*

dNK – Células *Natural Killers* decíduais

IP-10 – Proteína induzida por interferon- γ

OMS – Organização Mundial da Saúde

OXPHOS – Oxidação Fosforilativa

PE – Fosfatidiletanolamina

PS – Fosfatidilserina

Rgs4 – *Regulator of G Protein Signaling*

SZC – Síndrome Congênita do Zika

SNC – Sistema Nervoso Central

TEA – Transtorno do Espectro Autista

TLRs – *Toll-like receptors*

WT – *Wild Type*

ZIKV – Vírus Zika

Índice de figuras

Figura 1: Diagrama estrutural do ZIKV.....	20
Figura 2: Ciclo replicativo do ZIKV na célula hospedeira.	21
Figura 3. Desenvolvimento placentário no camundongo.	27
Figura 4: Organização da placenta murina.....	28
Figura 5. Principais eventos do desenvolvimento cerebral em camundongos e humanos.	31
Figura 6:.....	32
Figura 7: Resposta imune materna altera o desenvolvimento cerebral fetal.	34
Figure 8: Ilustração da via de sinalização de IFN do tipo I e III.....	37
Figura 9: Esquema de cruzamento aplicado no modelo experimental.....	41
Figura 10: Painel de imunofenotipagem aplicado para às células imunes isoladas da placenta de camundongos infectados com ZIKV	45
Figura 11: Painel de imunofenotipagem aplicado às células isoladas do baço de camundongos infectados com ZIKV.....	46
Figura 12: Painel de imunofenotipagem aplicado às células isoladas do linfonodo de camundongos infectados com ZIKV.....	47
Figure 13: Espectrogramas representativos das vocalizações ultrassônicas (USVs) emitidas por filhotes dos grupos PBS e E12.5.	48
Figura 14: Fêmeas grávidas hSTAT2KI apresentam maior carga viral e marcadores inflamatórios no sangue.....	50
Figure 15: Imunofenotipagem do baço entre fêmeas grávidas infectadas com ZIKV..	51
Figure 16: Imunofenotipagem de células imunes inatas do linfonodo de fêmeas grávidas infectadas com ZIKV..	52
Figure 17:Análise de carga viral de placentas após 7 dias de infecção com ZIKV durante a gestação	54
Figura 18: Placentas hSTAT2KI provenientes de mães KI apresentaram níveis mais elevados de marcadores inflamatórios em comparação tanto às placentas WT quanto às KI provenientes de mães WT.....	55
Figura 19: Imunofenotipagem placenta 7 dias após a infecção com ZIKV (APCs e neutrófilos).....	57
Figura 20: Imunofenotipagem da placenta 7 dias após a infecção com ZIKV (Células NK e Linfócitos).....	58
Figura 21: Placentas hSTAT2KI de fêmeas apresentam maior carga viral e níveis mais elevados de marcadores inflamatórios em comparação às placentas de machos.	60
Figura 22: Marcadores diferenciais entre placenta de machos e de fêmeas após infecção com ZIKV durante a gestação..	62
Figura 23: Detecção de RNA viral e citocinas no líquido amniótico.	
Figura 24: Análise de carga viral e citocinas no cérebro fetal após infecção durante a gestação. ...	66
Figura 25: Fêmeas hSTAT2 mantêm a expressão de genes pró-inflamatórios no cérebro após o nascimento..	67
Figura 26. Alterações em linfócitos T CD8⁺ na prole hSTAT2KI originadas em mães também KI.	69
Figura 27: Fêmeas hSTAT2KI apresentam alteração comportamental após o nascimento.....	71
Figura 28: Expressão diferencial de Axl na placenta de fêmeas durante a homeostase.	
Figura 29: Alterações a longo prazo na prole fêmea hSTAT2KI após exposição ao ZIKV durante a gestação.	73
Figura 30: Modelo proposto reportando as diferenças sexuais nas respostas à infecção por ZIKV durante o desenvolvimento fetal.	81
Figure 31: Imagens representativas em confocal de micróglia coradas com faloidina.	83
Figura 32: Adaptações do metabolismo microglial.	84
Figura 33: Adaptação metabólica da micróglia em estado de ativação.	85

Figura 34: Translocação de NF-kb durante a infecção pelo ZIKV.....	94
Figura 35: Detecção do ZIKV em células microgliais infectadas.	95
Figura 36: Avaliação da dinâmica mitocondrial em resposta ao ZIKV.	97
Figura 37: Avaliação das adaptações metabólicas da micróglia após a infecção com o ZIKV.....	99
Figura 38. Modelo proposto para as adaptações metabólicas adotadas pela micróglia em resposta à infecção do ZIKV.	104

Introdução Geral

Vírus Zika: Aspectos epidemiológicos, moleculares e tropismo celular

O vírus Zika (ZIKV), atualmente classificado no gênero *Orthoflavivirus*, conforme a nova nomenclatura adotada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Postler et al., 2023), é majoritariamente transmitido por mosquitos *Aedes Aegypti* e pertence ao grupo dos arbovírus. Isolado pela primeira vez em 1947 na Floresta Zika, em Uganda, África, o ZIKV circulou por décadas em regiões da Ásia e África, causando surtos esporádicos caracterizados por casos assintomáticos, ou sintomas leves quando sintomáticos (World Health Organization (WHO), 2017). O cenário mudou a partir das epidemias na Micronésia em 2007 e Polinésia Francesa em 2013, seguidas da epidemia estrondosa nas Américas em 2015 e 2016, na qual o Brasil foi o país mais afetado desde a descoberta desse vírus, com cerca de 1.673.272 casos prováveis registrados no pico da epidemia (W. K. de Oliveira et al., 2017). Dez anos após o surto inicial, o número de casos de Zika em 2025 foi de apenas 148, uma notificação considerada baixa quando comparada à de outras arboviroses, especialmente a Dengue, com 139.241 casos, e ao vírus reemergente Oropouche (OROV), com 2.791 casos confirmados (Ministério da Saúde, 2025). Ainda assim, o estudo contínuo de Zika permanece essencial, uma vez que foi constatada uma circulação silenciosa do vírus ao longo dos anos em cerca de 92 países, o que acende um alerta para a possibilidade de reemergência desse vírus em cenários de soroprevalência reduzida em uma determinada população (Ryan et al., 2021).

A epidemia de Zika destacou as manifestações mais graves associadas à infecção por esse patógeno. Entre essas, incluem-se as evidências mais consistentes acerca do tropismo do vírus por células neurais periféricas, que pode desencadear o desenvolvimento da rara Síndrome de Guillain-Barré (SGB) (Barbi et al., 2018; Wachira et al., 2021). No Brasil, aproximadamente 470 casos de SGB associados à infecção pelo ZIKV foram registrados entre 2013 e 2018, sendo o Nordeste e o Sudeste as regiões que apresentaram o maior número de notificações (Graciano et al., 2020). Outras complicações associadas à infecção do ZIKV no Sistema Nervoso Central (SNC) em adultos também foram reportadas, entre elas a meningoencefalite (Carteaux et al., 2016) e mielite aguda (Mécharles et al., 2016). Mais relevante, no entanto, é o impacto da infecção durante a gestação, uma vez que o ZIKV é capaz de ultrapassar a barreira placentária e alcançar o compartimento fetal através da infecção vertical (Calvet et al., 2016). No ambiente fetal, o vírus apresenta elevado tropismo por células progenitoras neurais, o que contribui significativamente para o seu potencial teratogênico,

caracterizado principalmente por anomalias no SNC do feto, como a microcefalia (H. Li et al., 2016; Tang et al., 2016; N. Zhang et al., 2016). O conjunto de malformações congênitas causados pela transmissão vertical é denominado como a Síndrome congênita do ZIKV (SCZ), descrita pela primeira vez em 2016 (De Barros Miranda-Filho et al., 2016). Segundo o Ministério da Saúde (MS), com base em dados coletados entre os anos de 2015 e 2023, foram registrados 22.251 casos suspeitos de SCZ, dos quais 16% tiveram confirmação da infecção congênita (Da Saúde, 2023). Os distúrbios neurológicos descobertos após a exposição neonatal ao ZIKV levaram a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar uma situação emergencial em saúde pública de interesse global (CDC, 2019), para que a comunidade científica unisse esforços para entender a sua patogênese e encontrar possíveis tratamentos para amenizar os danos causados pela epidemia desse arbovírus capaz de causar neurovirulência.

Assim como outros membros da família *Flaviviridae*, o ZIKV é um vírus envelopado com genoma de RNA fita simples de sentido positivo (ssRNA+) (Sirohi & Kuhn, 2017). O genoma do ZIKV é capaz de codificar uma poliproteína, a qual é processada através de proteases virais e do hospedeiro em suas três proteínas estruturais (capsídeo (C), envelope (E) e pré-membrana (PrM)), bem como em sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Sirohi & Kuhn, 2017), como representado na Figura 1. Além do seu papel na formação da partícula viral, as proteínas estruturais também são cruciais para mediar a montagem da partícula viral e no processo de entrada do vírus na célula (Sirohi & Kuhn, 2017). Enquanto as proteínas não-estruturais possuem como função mediar a replicação do genoma viral, auxiliar na montagem eficiente do vírus e, de maneira muito importante, modular a resposta imune da célula hospedeira (Tan et al., 2020). Uma discussão mais aprofundada será desenvolvida no tópico 1.4, ressaltando a importância das proteínas não-estruturais para o desenvolvimento de modelos animais adequados para estudar a patogênese do ZIKV.

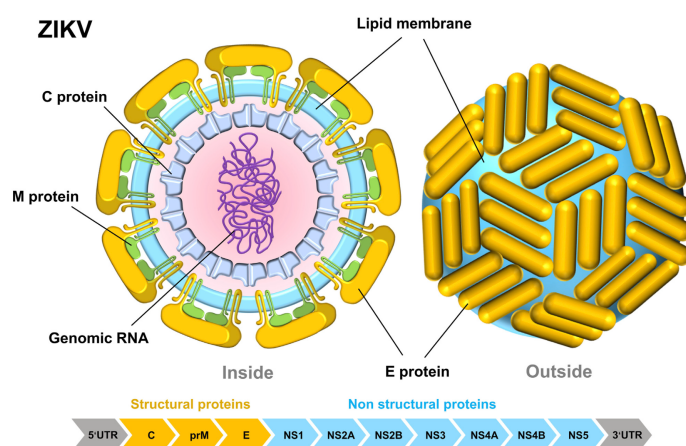


Figura 1: Diagrama estrutural do ZIKV. As ilustrações esquemáticas representam os componentes internos do ZIKV (à esquerda), como o genoma viral, proteínas associadas ao capsídeo e as proteínas de membrana, bem como a organização externa do envelope viral (à direita), incluindo a proteína de envelope. Adaptado de Yingqi Feng, 2024. *Frontiers in Pharmacology*

O envelope viral do ZIKV é derivado da membrana do retículo endoplasmático da célula hospedeira e é composto principalmente por lipídios, como colesterol, fosfatidiletanolamina (PE) e, especialmente, fosfatidilserina (PS) (L. Zhang et al., 2020). Este enriquecimento em PS desempenha um papel crucial no mimetismo apoptótico, uma estratégia empregada pelo vírus para facilitar sua entrada nas células-alvo ao interagir com receptores celulares que se ligam à PS, como os das famílias *T-cell immunoglobulin and mucin domain* (TIM, em especial TIM-1) e TAM, composta por Tyro3, Mer e AXL. Enquanto a família TIM se liga diretamente à PS, os receptores TAM se ligam de forma indireta através do ligante *growth arrest-specific 6* (Gas6). Embora os principais receptores descritos, como o AXL e TIM-1 (Meertens et al., 2017; Nowakowski et al., 2017; Strange, Jiyarom, Pourhabibi Zarandi, et al., 2019; Strange, Jiyarom, Zarandi, et al., 2019), sejam amplamente expressos em diversos tipos celulares, o ZIKV demonstra um tropismo acentuado por determinados alvos. Entre eles, destacam-se células placentárias (Tabata et al., 2016; Wu et al., 2023), células progenitoras neurais (Silva-Filho et al., 2021; Souza et al., 2016), astrócitos (Ledur et al., 2020; Stefanik et al., 2018), células endoteliais (J. Zhou et al., 2019), neutrófilos (Aggio et al., 2022), microglia (Lum et al., 2017), e macrófagos, incluindo os macrófagos presentes na placenta, conhecidos como células Hofbauer (Quicke et al., 2016).

O ancoramento da partícula viral ao receptor de entrada na célula hospedeira é um passo crucial para o estabelecimento da infecção. Através da interação entre a proteína E do

ZIKV com os receptores de TIM e TAM, em especial AXL e TIM-1, o processo de endocitose mediado por clatrina é iniciado (Figura 2). Com a acidificação do compartimento endossômico ocorre a exposição do *loop* de fusão da proteína E, permitindo a fusão entre a membrana viral e a endossômica, processo essencial para a liberação do RNA do nucleocapsídeo para o citoplasma (Feng, 2024). A tradução da poliproteína ocorre na membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER), sendo posteriormente processada através de modificações pós-traducionais para gerar as proteínas estruturais e não-estruturais individuais. Estas últimas auxiliam na montagem dos complexos de replicação membranosos (CRM) envolvidos na replicação do genoma viral (Verhaegen & Vermeire, 2024). Cada molécula de RNA viral é empacotada no processo de “encapsidação”, dando origem a nova partícula viral imatura. Essas partículas seguem para o compartimento trans do Golgi em vesículas das vias secretórias, onde ocorre o processamento da PrM em peptídeos pr e proteínas M. Estas se associam à proteína E para formar heterodímeros M-E, resultando nos vírions maduros. Estes, por sua vez, são liberados por exocitose para iniciar um novo ciclo viral (Feng, 2024). Além de desempenharem um papel na evasão da resposta imune hospedeira e na montagem dos CRMs, as proteínas não-estruturais estão envolvidas também na redução da expressão dos receptores de entrada viral na membrana da célula hospedeira, por meio da indução da autofagia, um mecanismo que pode favorecer a replicação das partículas já internalizadas, tornando determinados tipos celulares potenciais sítios de replicação (Yu et al., 2025) (Figura 2).

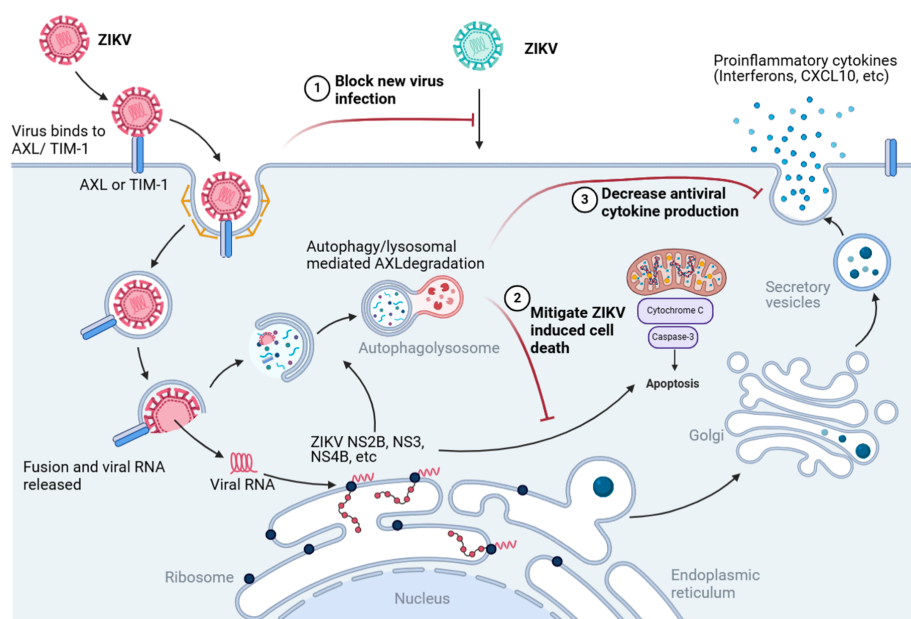


Figura 2: Ciclo replicativo do ZIKV na célula hospedeira. Interação da proteína E com receptores como AXL e TIM-1 inicia a endocitose do ZIKV. Após a fusão entre membranas, o RNA viral é liberado no citoplasma para tradução no RER

Análises filogenéticas constatarem duas linhagens principais do ZIKV que apresentam uma diferença de aproximadamente 75-100 aminoácidos: a Africana (que inclui a variante MR-766) e a Asiática (que inclui as variantes PRVABC-59 e a PE243) (Weaver et al., 2016), as quais sofreram uma mudança evolutiva na estrutura genética e molecular ao longo das últimas cinco décadas (Beaver et al., 2018). É interessante notar que mesmo que a linhagem Asiática tenha sido a causa de casos esporádicos de Zika no período pré-epidêmico, nenhum caso de anomalia congênita e SZC foi reportado anteriormente aos surtos causados pelas variantes contemporâneas (Phimister et al., 2016). Um estudo recente em modelo animal demonstrou que todas as variantes Asiáticas são neurovirulentas. No entanto, as variantes contemporâneas exibem uma resposta imunológica mais atenuada em comparação às pré-epidêmicas, que demonstraram maior patogenicidade em embriões (Darmuzey et al., 2024). Com base nesses dados, sugere-se que a atenuação patológica foi um fator importante para o surgimento da SZC após a exposição ao ZIKV, permitindo a sobrevivência do feto até o nascimento, em vez de causar morte prematura durante o período fetal (Darmuzey et al., 2024). Essa atenuação na patologia também reflete na infecção vertical pelo ZIKV, que pode levar a quadros clínicos variados, abrangendo desde ausência de anomalias congênitas detectáveis até manifestações moderadas à graves, como microcefalia severa, que ocorre em aproximadamente 6% a 12% dos casos relatados (Jaenisch et al., 2017; Metzler & Tang, 2024). Dentre fatores associados a essa grande variação na incidência e gravidade da SZC, destacam-se alguns pontos envolvendo o vírus, o organismo hospedeiro, acesso à saúde básica, aspectos sociais e ambientais (Kousa & Hossain, 2021). Enquanto os casos mais graves são mais facilmente diagnosticados, as manifestações mais sutis, que representam a maioria dos casos, requerem exames mais aprofundados, como neuroimagem e acompanhamento neuropsicomotor ao longo do tempo. Isso evidencia um grupo majoritário de crianças que frequentemente enfrenta negligência em relação aos dados clínicos disponíveis: aquelas expostas ao vírus durante o período pré-natal, mas que nasceram sem evidências da SZC.

Investigar esse aspecto se torna ainda mais relevante a partir do conhecimento de que tanto a ativação do sistema imune materno causada pela exposição a um patógeno (Kalish et al., 2021; Tartaglione et al., 2022), quanto a infecção vertical em si causa um impacto ao processo de neurogênese durante o desenvolvimento fetal (Benazzato et al., 2024), e possuem

um potencial de induzir transtornos neurocomportamentais ao longo da vida, mesmo que as malformações congênitas não tenham sido identificadas. Além desse contexto, um artigo publicado em 2022, baseado em um estudo da população brasileira que analisou dados de nascimentos entre 2015 e 2018, revelou uma prevalência aproximadamente 20% maior de SZC em meninas em comparação aos meninos (Paixão et al., 2022). No entanto, apesar da relevância desse achado utilizando dados humanos, os mecanismos subjacentes a essa suscetibilidade relacionada ao sexo ainda não são compreendidos, e as possíveis explicações biológicas para esse efeito permanecem desconhecidas. Esses pontos nos mostram que, mesmo após dez anos desde a epidemia que atingiu as Américas, ainda há diversos aspectos a serem estudados e compreendidos acerca do vírus na interface materno-fetal. Isso é essencial para que possamos entender sua patogênese por completo, indo além da bem-documentada microcefalia congênita e dos fatores correlacionados a uma maior suscetibilidade de meninas expostas ao vírus durante o desenvolvimento fetal.

Capítulo 1: Investigação da contribuição da resposta imune materna para a patogênese do ZIKV nos descendentes

1. Introdução

1.2 Interface materno-fetal e a transmissão vertical

A preocupação majoritária durante a epidemia do ZIKV no Brasil foi o substancial aumento de neonatos apresentando microcefalia após gestantes terem sido expostas ao vírus, especialmente durante o primeiro trimestre de gestação. Atualmente, sabe-se que o ZIKV é capaz de infectar tanto células de origem materna quanto fetal, incluindo as da placenta, permitindo que o vírus atravesse a barreira placentária e cause desordens no desenvolvimento fetal, especialmente no cérebro, nos casos mais severos (Q. Chen et al., 2020a; Quicke et al., 2016; Villazana-Kretzer et al., 2022). Além disso, outras complicações gestacionais também têm sido associadas à infecção pelo ZIKV, como insuficiência placentária e restrição de crescimento fetal (Brasil et al., 2016). Esses efeitos, em conjunto, são remanescentes das alterações observadas pelo grupo de patógenos associados às infecções congênitas, sendo estes abrangidos pelo acrônimo TORCH (*Toxoplasma gondii*, Outros, vírus da Rubéola, Citomegalovírus e Herpes vírus). Considerando esse aspecto, o ZIKV é atualmente incluído também nesse grupo (Kovacs, 2020a), e a comunidade científica tem discutido de forma aprofundada a importância de compreender os efeitos a longo prazo em crianças expostas à infecção congênita. Esses impactos podem representar um desafio contínuo à saúde pública no país, assim como ocorre com outras infecções do grupo TORCH. Contudo, para iniciar uma discussão mais aprofundada sobre os mecanismos de infecção vertical do ZIKV, uma descrição acerca da função placentária e dos componentes que caracterizam a interface materno-fetal deve ser atribuída. Essa abordagem permite compreender o que já foi descrito na literatura e identificar as lacunas que ainda precisam ser preenchidas para elucidar completamente a patogênese.

1.2.1 Organização estrutural da placenta

A placenta é um órgão temporário que conecta o útero materno ao embrião durante a gestação, desempenhando como função primordial a mediação do transporte de nutrientes e oxigênio ao compartimento fetal. Por ser um tecido de origem fetal, o desenvolvimento, crescimento e maturação da placenta estão diretamente ligados à dinâmica de diferenciação e organização celular do blastocisto (Panja & Paria, 2021). Esse processo é guiado por uma

extensa rede de fatores de transcrição, que direcionam as células do blastocisto aos seus destinos, compondo o embrião propriamente dito ou contribuindo para a formação da placenta, marcando, assim, a primeira grande bifurcação no desenvolvimento celular (S. J. Arnold & Robertson, 2009).

Em camundongos, o momento da fecundação geralmente é considerado como dia embrionário 0 (E0) que, por convenção, é marcado como se ocorresse à meia-noite do dia em que os animais foram acasalados durante a noite (Pang et al., 2014). A manhã seguinte é denominada como E0.5, e, caso a fecundação tenha ocorrido, o zigoto, resultante da união entre o óvulo e o espermatozoide, já está formado neste momento (ilustrado em E0.5 da Figura 3). O processo de placentação, ou formação da placenta, inicia-se com o desenvolvimento do blastocisto, que se implanta na parede uterina por volta do dia embrionário 4.5 (E4.5) após a fertilização (Elmore et al., 2022) (ilustrado em E4.5 da Figura 3). A implantação também induz um processo especializado de remodelação das células do estroma uterino materno, conhecido como “decidualização”, através da influência dos hormônios estrogênio e progesterona (Hemberger et al., 2020). Durante esse processo, as células estromais do endométrio materno sofrem alterações morfológicas e funcionais, resultando na formação da decídua (Dec), sendo este o tecido uterino que estabelece a interface entre a mãe e o embrião. A decídua é rica em células imunes maternas, como células *natural killers* deciduais (dNK), células linfoides inatas (ILCs), macrófagos, células dendríticas (DCs) e células T (L. Liu et al., 2020). A presença de células imunes maternas é essencial para garantir a imunovigilância na interface materno-fetal. No entanto, a manutenção de uma resposta inflamatória controlada é essencial para que o sistema imunológico materno tolere o feto semialogênico (M. Wang et al., 2024; H. Zhou et al., 2023). Isso possibilita a criação de um ambiente imunoprivilegiado no lado fetal, protegendo-o de ataques imunológicos potenciais e garantindo o desenvolvimento adequado da gestação.

Após a implantação, a camada externa do blastocisto, denominada trofotoderma (TE) nos estágios iniciais, passa a ser referida como trofoblasto. A partir da porção polar do TE, forma-se a ectoderma extraembrionária (ExE), uma estrutura que contribui significativamente para a formação da placenta (em E6.5 da Figura 3). Com a gastrulação ocorrendo no dia E6.5, forma-se a mesoderme extraembrionária, que posteriormente dá origem à membrana denominada alantoide (All), que forma o compartimento vascular fetal. Além disso, contribui para a formação das camadas estruturais do âmnio (Amn) e do cório (Ch), duas membranas

fundamentais para a nutrição e proteção do embrião (em E7.5 da Figura 3) (Hemberger et al., 2020). Aproximadamente em E8.5, ocorre um outro processo essencial para a maturação da placenta: a fusão cório-alantoide. Esse evento permite que os vasos sanguíneos derivados do mesoderma fetal invadam a camada trofoblástica do cório e se entrelacem com os seios sanguíneos maternos revestidos por trofoblastos, originando a estrutura básica do labirinto placentário, região onde ocorre a troca de nutrientes, gases e resíduos entre mãe e feto (Panja & Paria, 2021). A presença de células progenitoras multipotentes contribui para a expansão e complexificação desse compartimento, promovendo a contínua diferenciação dos trofoblastos em sinciotrofoblastos (SynTI e SynTII), que formam camadas multinucleadas por meio da fusão célula-célula, e em células gigantes trofoblásticas sinusoides (S-TGC) (Elmore et al., 2022; Hemberger et al., 2020). Esses eventos ocorrem predominantemente em E9.5 e E10.5, conforme ilustrado na figura 3, e detalhados com maior precisão na Figura 4. Por volta de E10.5 os spongiotrofoblastos (SpT) e os trofoblastos glicogênicos (GlyT) formam o principal compartimento endócrino da placenta situado entre o labirinto e a decídua, conhecido como zona juncional, responsável pela produção de hormônios fundamentais para a manutenção da gestação e o crescimento saudável do feto (Panja & Paria, 2021). A placenta atinge sua

estrutura definitiva entre os dias gestacionais 11.5 e 12.5, permanecendo ativa até o nascimento, que ocorre por volta de E19.5 (representada em E14.5 da figura 3).

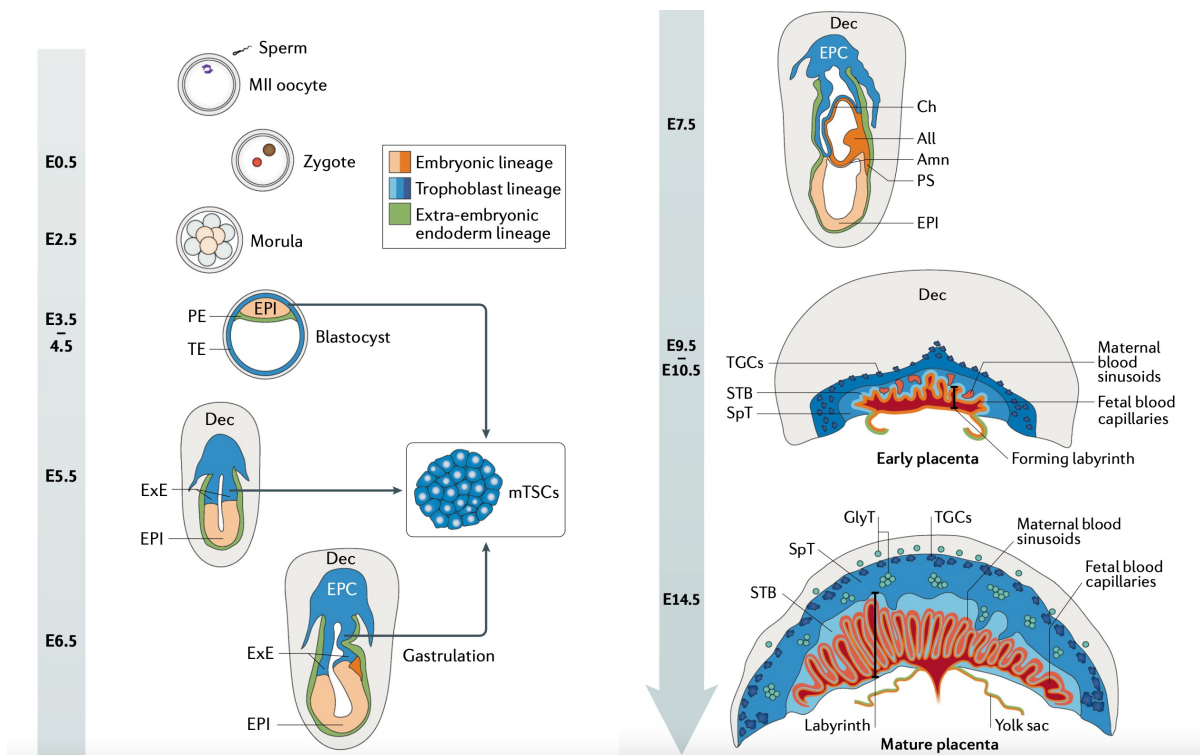


Figura 3. Desenvolvimento placentário no camundongo. Após a fertilização, o zigoto sofre divisões até formar a mórula (E2.5) e, em seguida, o blastocisto (E3.5), com diferenciação entre trofoblasta e massa celular interna. A gastrulação (E6.5) origina o âmnio, cório e alantoide. A fusão cório-alantoide permite a formação do labirinto placentário, que se complexifica até E14.5 para facilitar trocas materno-fetais. Sinciotrofoblastos formam a principal superfície de troca, enquanto células gigantes trofoblásticas, spongiotrofoblastos e trofoblastos glicogênicos compõem o compartimento endócrino da placenta. Adaptado de Hemberger et al., 2020. Nature Reviews

Alterações no desenvolvimento ou na função da placenta apresentam ameaças significativas à gestação, podendo resultar em perda fetal, parto prematuro, restrição ao crescimento intrauterino e pré-eclampsia. Além disso, falhas ao desenvolvimento placentário vêm sendo progressivamente discutidas como fator contribuinte para transtornos neurocomportamentais, devido ao possível papel da placenta na produção de moléculas capazes de modular o neurodesenvolvimento (Hodyl et al., 2017; O’Keeffe & Kenny, 2014). Nesse contexto, embora a placenta comumente atue como uma barreira seletiva entre mãe e feto, ela não impede completamente a passagem de certos agentes. Patógenos como o ZIKV podem atravessar a barreira placentária, alcançando o feto em desenvolvimento e provocar inflamação e danos placentários, comprometendo tanto o ambiente intrauterino quanto o desenvolvimento neurológico (Coyne & Lazear, 2016).

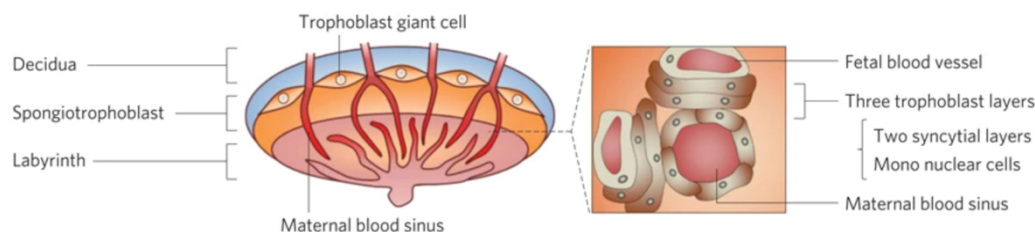


Figura 4: Organização da placenta murina. Ilustração esquemática mostrando as principais camadas da placenta do camundongo: decidua materna, spongiotrofoblastos (spongiotrophoblast) representando a zona juncional e labirinto placentário. À direita, o detalhe do labirinto mostra os vasos sanguíneos fetais rodeados por três camadas de trofoblastos, incluindo duas camadas sinciciais (camadas multinucleadas formadas por fusão célula-célula de trofoblastos) e uma camada de células mononucleadas, que se interpõem entre o sangue materno e o fetal, permitindo trocas gasosas e nutricionais. Adaptado de Yamashita et al., 2011. Nature Nanotechnology

1.2.2 Infecção vertical do ZIKV

Estudos iniciais buscaram identificar quais células que compõem a interface materno-fetal apresentam tropismo pelo ZIKV, com o objetivo de elucidar o mecanismo específico pelo qual o vírus atravessa a barreira placentária. Por meio de modelos *in vitro* e *in vivo*, foi demonstrado que os macrófagos fetais, conhecidos como células de Hofbauer, células endoteliais fetais e os trofoblastos, tanto da zona juncional, quanto do labirinto, são infectados pelo ZIKV e são capazes de sustentar a replicação do vírus (Megli & Coyne, 2022; Weisblum et al., 2017). Análises de tecidos obtidos de placentas humanas de mulheres infectadas comprovam a presença do RNA e antígenos virais, sugerindo que a infecção do feto ocorra via transplacentária (Tabata et al., 2018). Adicionalmente, dados da literatura indicam tanto uma maior capacidade de replicação viral no tecido placentário quanto uma maior prevalência de SZC quando a infecção ocorre no primeiro trimestre de gestação, reforçando que esse é o período mais crítico para a transmissão vertical (Kovacs, 2020). Inicialmente, sugeriu-se que esse efeito poderia ser atribuído ao estágio inicial de desenvolvimento do SNC do feto, que seria potencialmente mais vulnerável à patologia viral. Contudo, recentemente, outro possível mecanismo tem sido discutido na literatura, baseado no entendimento das mudanças no perfil inflamatório materno, que também influenciam a suscetibilidade da barreira placentária conforme o estágio gestacional. Por exemplo, foi reportado que o interferon do tipo III (IFN-III), também conhecido como IFN λ , pode desempenhar um papel importante no controle viral, já que sua detecção na placenta aumenta nos períodos mais avançados da gestação (Casazza et

al., 2022; Jagger et al., 2017). Para infectar o tecido, o vírus precisa, portanto, evadir essa resposta imune. O receptor de IFN λ é majoritariamente expresso em células epiteliais e imunes, e o aumento da produção da citocina em estágios tardios pode contribuir para a restrição da replicação viral, ajudando a explicar a menor incidência de SCZ quando a infecção ocorre o terceiro trimestre. Portanto, soma-se a isso a menor vulnerabilidade do tecido fetal, o que, em conjunto, sustenta a hipótese de uma suscetibilidade gestacional dependente de estágio (Bayer et al., 2016).

No contexto das discussões sobre os mecanismos da infecção transplacentária pelo ZIKV, a participação de células maternas tem emergido como uma perspectiva nova na disseminação do vírus para o tecido fetal. Evidências sugerem que a capacidade do vírus de infectar e replicar em células maternas possa amplificar sua circulação para o compartimento fetal, complementando a já conhecida habilidade do ZIKV de infectar células placentárias (Alippe et al., 2024). Nesse aspecto, foi sugerido que células estromais da decídua infectadas possam secretar fatores que têm a capacidade de aumentar a permissividade de trofoblastos (Guzeloglu-Kayisli et al., 2020). Também foi reportado que, enquanto o tecido placentário se torna mais resistente à infecção em estágios gestacionais mais avançados, a decídua permanece suscetível, sugerindo que o tecido materno possa agir como um reservatório e sítio de transmissão do vírus também em períodos mais tardios (Weisblum et al., 2017b). Além da decídua, um outro possível mecanismo foi proposto, o qual abordou que neutrófilos maternos infectados pelo ZIKV poderiam infiltrar a placenta, e, além de aumentar a inflamação local, poderiam agir como “cavalo de troia” na transmissão do vírus ao compartimento placentário (Zanluqui et al., 2021). De forma geral, estudos evidenciam que o lado materno tem o potencial de impactar sim a patogênese do ZIKV, além do efeito direto do vírus infectando células de origem fetal. Isso se torna particularmente relevante ao considerarmos que a infecção vertical ocorre em apenas uma pequena parcela dos casos, destacando o potencial de outros fatores, como os maternos, na modulação da patogênese do vírus durante a gestação (Jagger et al., 2017; Kovacs, 2020b). Considerar a contribuição do lado materno na discussão sobre a transmissão vertical pode abrir novos caminhos cruciais para compreender a patogênese do ZIKV em crianças expostas durante a gravidez, independentemente de serem diagnosticadas ou não com anomalias congênitas associadas à SZC.

1.3 Ativação do sistema imune materno e transtornos do neurodesenvolvimento

Após uma década desde a epidemia de ZIKV no Brasil, a literatura discutiu extensivamente a transmissão vertical e o desenvolvimento da SCZ. No entanto, ainda há um grupo significativo de crianças expostas ao vírus durante a gestação que não apresentaram anomalias congênitas detectáveis no nascimento, sendo, portanto, classificadas como saudáveis. Contudo, a exposição à inflamação aumentada no período pré-natal, causada, por exemplo, por infecções durante a gravidez, possui o potencial de impactar a função placentária e o desenvolvimento fetal, mesmo sem anomalias congênitas evidentes ao nascimento. O cérebro em fase de desenvolvimento é particularmente sensível às sinalizações ambientais, tornando os processos inflamatórios durante a gestação um potencial risco para a formação dos circuitos neurais (Knuesel et al., 2014). Considerando que o desenvolvimento neural envolve processos altamente coordenados, como a proliferação e migração de neurônios e células da glia, formação de sinapses, mielinização e organização dos circuitos neurais, a inflamação materna durante a gestação pode interferir em etapas vulneráveis desse processo, contribuindo para disfunções neuronais e alterações comportamentais observadas na prole ao longo da vida (Figura 5) (Knuesel et al., 2014; Schepanski et al., 2018). Esse tópico é atualmente um dos pilares para compreender transtornos do neurodesenvolvimento, como o transtorno do espectro autista (TEA), em que a ativação do sistema imune materno (*Maternal Immune Activation – MIA*) possui uma forte associação a alterações no neurodesenvolvimento. A hipótese aborda que além de fatores genéticos, como variantes dos genes *SHANK3* e *CNTNAP2* (Jang et al., 2023; Tripathi et al., 2024), o ambiente gestacional também poderia contribuir para o surgimento de transtornos neuropsiquiátricos. Estudos baseados em dados humanos e modelos animais convergem para o mesmo ponto: infecções variadas ou processos inflamatórios que demandam hospitalização durante o estágio inicial de gestação estão associados a um risco aumentado de transtornos neuropsiquiátricos nos descendentes (Atladóttir et al., 2010; Choi et al., 2016; Kalish et al., 2021; Lee et al., 2015).

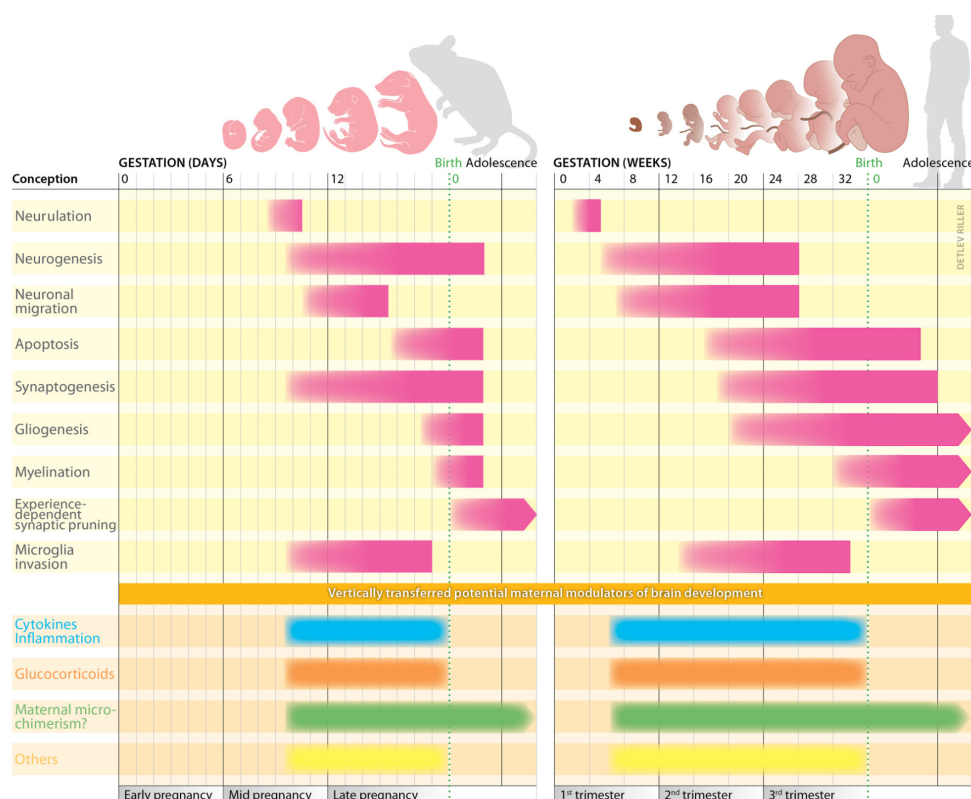


Figura 5. Principais eventos do desenvolvimento cerebral em camundongos e humanos. A formação do tubo neural (neurulação) marca o início do desenvolvimento do sistema nervoso central. Em camundongos, esse processo ocorre por volta de E8.5–E9.5, seguido por neurogênese, migração neuronal e sinaptogênese até o final da gestação (E19.5). Células da micróglia derivadas do saco vitelino invadem o tecido cerebral em desenvolvimento a partir de E9.5. Processos como mielinização e *pruning* sináptico ocorrem majoritariamente após o nascimento em camundongos. Esses eventos são altamente sensíveis a interferências no ambiente gestacional, com impacto potencial na organização funcional do cérebro. Citocinas, glicocorticoides, e células imunes maternas, estas que dão origem ao microchimerismo, são fatores transmitidos de forma controlada do lado materno ao fetal, através da transferência vertical. Contudo, situações de estresse ou infecções durante o período gestacional podem alterar a produção desses fatores, os quais podem ser transferidos ao compartimento fetal e afetar etapas cruciais do neurodesenvolvimento. Adaptado de Schepanski et al., 2018. *Frontiers in Immunology*

As primeiras evidências entre infecções durante a gestação e seu impacto em transtornos no neurodesenvolvimento se iniciou com a epidemia de rubéola, que ocorreu em meados de 1960. Estudos conduzidos em crianças que tiveram a infecção congênita apontaram maior risco de desenvolvimento de transtorno neuropsiquiátricos, como TEA, e esquizofrenia (Brown et al., 2001; Chess, 1971). Posteriormente, foi observado que infecções do trato respiratório durante o segundo trimestre de gestação poderia aumentar o risco de esquizofrenia nos descendentes, especialmente associados à infecção por influenza (Brown et al., 2004). Dada sua relevância global, essa discussão remete à pandemia causada pelo SARS-CoV-2, vírus responsável pela doença do coronavírus 2019 (COVID-19), que pode evoluir para a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG). Um estudo publicado em 2023 identificou uma associação entre a infecção materna por SARS-CoV-2 durante a gestação e um risco aumentado

de diagnóstico de transtornos do neurodesenvolvimento em filhos do sexo masculino, mas não em meninas (Edlow et al., 2023). Curiosamente, evidências mais recentes (2024) demonstraram que gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2 apresentam respostas imunes alteradas em comparação com mulheres não grávidas infectadas, incluindo um aumento atípico de linfócitos T CD8⁺CD4⁺, sugerindo uma modulação imunológica específica da gravidez frente à infecção viral (Oh et al., 2024).

Em termos gerais, o organismo materno durante a gestação passa por um desafio complexo entre tolerar o feto em desenvolvimento, mas, ao mesmo tempo, montar uma resposta imune adequada para protegê-lo de infecções. Os modelos de MIA têm sido essenciais para o melhor entendimento dessa relação ao longo dos anos (figura 6).

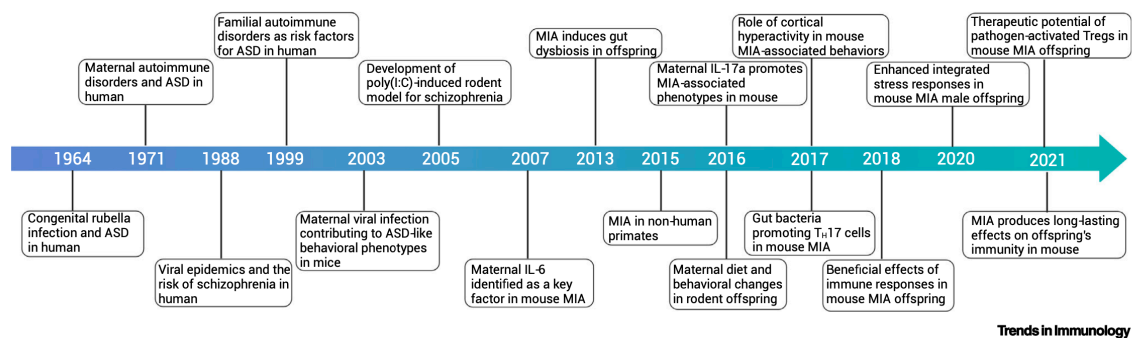


Figura 6: Breve linha do tempo mostrando os principais achados do modelo *Maternal Immune Activation* (MIA). Adaptado de Kwon et al., 2022. Trends in Immunology

Nos modelos animais de MIA, gerados principalmente pela aplicação do mimético viral poliinossínico:politidílico (poli(I:C)) ou de lipopolissacarídeo (LPS) durante a gestação de camundongos, foi demonstrado que o aumento de citocinas como IL-6, IL-1 β , IFN do tipo I e IL-17A desempenha um papel central tanto na indução de transtornos neuropsiquiátricos quanto no desenvolvimento de alterações imunológicas observadas no período pós-natal (Choi et al., 2016; Huh & Veiga-Fernandes, 2020; Kalish et al., 2021; E. Kim, Paik, et al., 2022a). Um dos estudos que mais contribuíram para essa discussão foi publicado em 2022 e demonstrou que a prole exposta à inflamação materna durante o período pré-natal apresentava maior suscetibilidade à inflamação intestinal no período pós-natal, quando desafiada. Esses animais também exibiam um fenótipo de predisposição imunológica, conhecido como *immune priming*, associado a alterações pós-natais na cromatina de linfócitos T CD4⁺ naive,

demonstrando um impacto ao sistema imune da prole exposta a longo prazo (E. Kim, Paik, et al., 2022a).

Os modelos de MIA demonstram níveis elevados da citocina IL-6 no soro materno, o que também se reflete em seu aumento na placenta, líquido amniótico e no cérebro fetal, indicando uma possível transferência de sinais inflamatórios entre mãe e feto (Smith et al., 2007). A compreensão sobre os impactos da IL-6 durante a gestação tem avançado com o uso de modelos animais de exposição pré-natal à essa citocina, os quais demonstraram ela pode causar um aumento prolongado nas sinapses excitatórias, além de elevar a atividade do *Regulator of G Protein Signaling 4* (Rgs4), potencialmente alterando a sinalização neuronal e a plasticidade sináptica (Mirabella et al., 2021). Dados de um estudo longitudinal em humanos mostraram que padrões de conectividade cerebral neonatal obtidos através de ressonância magnética funcional em repouso (fMRI), poderiam estimar os níveis maternos de IL-6 (Rudolph et al., 2018a). Adicionalmente, os níveis maternos de IL-6 explicaram parte da variabilidade observada no desempenho cognitivo das crianças, evidenciando que a inflamação gestacional se associa diretamente à arquitetura funcional do cérebro em desenvolvimento e às habilidades cognitivas nos primeiros anos de vida (Rudolph et al., 2018b).

Além da IL-6, uma linha de destaque no modelo de MIA é a participação das células T *helper* 17 (Th17) e de sua principal citocina, a IL-17A, uma vez que níveis elevados de IL-17A foram reportados em crianças diagnosticadas com TEA (AL-Ayadhi & Mostafa, 2012). Em 2016, um estudo de grande relevância para a área mostrou que células T que expressam o fator de transcrição ROR γ t, importantes produtoras de IL-17A, são essenciais para o estabelecimento do fenótipo comportamental observado no modelo de MIA em camundongos (Choi et al., 2016). Estudos adicionais demonstraram que elevados níveis de IL-17A materna podem levar ao aumento da expressão do receptor de IL-17A (IL-17AR) nos trofoblastos, processo que resulta no acúmulo dessa citocina na placenta, e no cérebro fetal (H. Kim, 2023). Além disso, evidências indicam o modelo de MIA induzido por (poli(I:C)) é capaz de causar estresse integrado de resposta no cérebro em desenvolvimento, o que afeta a síntese proteica global do cérebro fetal (Kalish et al., 2021). Outras citocinas também foram reportadas após a indução de modelos de MIA, como IL-1 β e IFN do tipo I. Em ratos, à exposição ao LPS no período pré-natal foi associada ao aumento de IL-1 β na prole após o nascimento, a qual também apresentou sinais de hipomielinização, astrogliose e aumento da expressão de marcadores microgliais no cérebro (Rousset et al., 2006, 2008). Em camundongos, a neutralização da via

de sinalização de IFN-I foi capaz de amenizar efeitos observados em micróglias de animais expostos ao modelo de MIA, indicando que essa via também pode ser importante para o fenótipo observado no período pós-natal (Ben-Yehuda et al., 2020). A figura 7 ilustra em detalhes o modelo experimental de MIA.

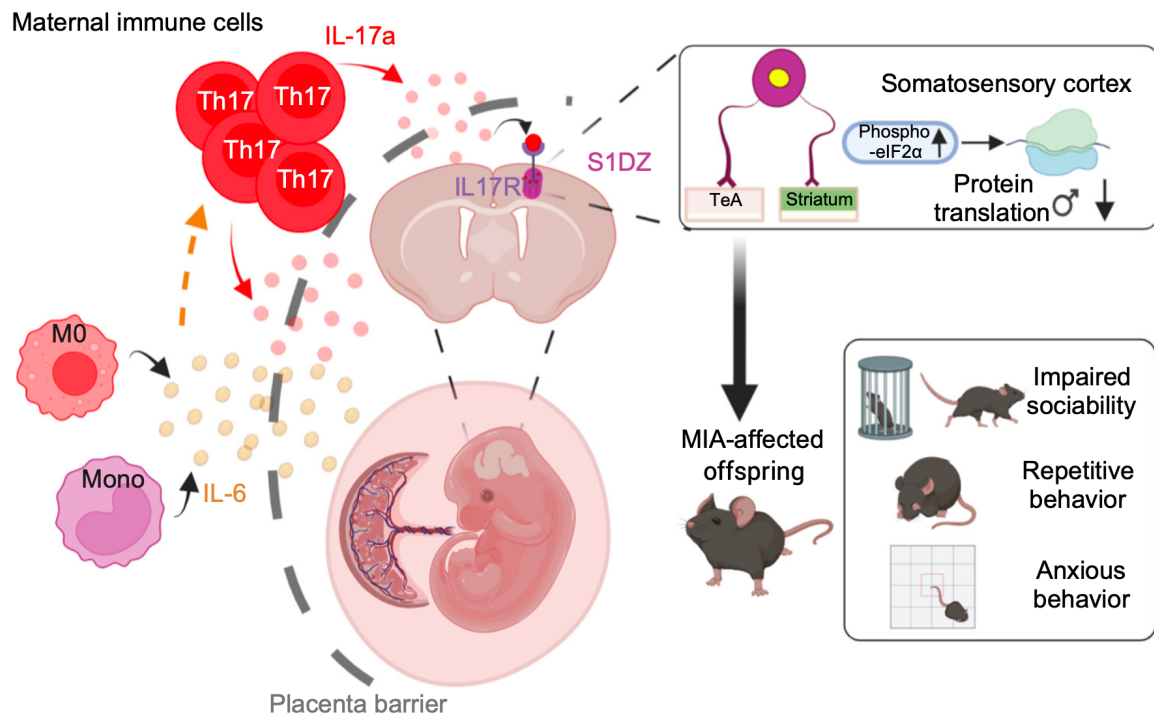


Figura 7: Resposta imune materna altera o desenvolvimento cerebral fetal. A figura ilustra como a MIA pode levar ao desenvolvimento anormal do cérebro fetal e a alterações comportamentais na prole. Durante a gestação, citocinas pró-inflamatórias, ilustradas aqui por IL-6 e IL17A, podem atravessar ou agir sobre a barreira placentária. A IL-17A materna ativa a resposta integrada ao estresse no cérebro fetal, afetando a síntese proteica. O receptor de IL-17A (IL-17R) é expresso em áreas corticais, como S1DZ, ligadas a regiões como o estriado e o córtex temporal, cuja atividade alterada contribui para déficits sociais, comportamentos repetitivos e ansiedade. Kwon et al., 2022. Trends in Immunology

1.3.1 ZIKV e a ativação do sistema imune materno

Estudos com amostras humanas sugerem que o ZIKV possa aumentar a produção de citocinas associadas à ativação, diferenciação, recrutamento ou manutenção da função de linfócitos T durante a fase aguda da doença. Entre essas citocinas destacam-se a IL-2, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13 e a proteína induzida por interferon- γ (CXCL10) (Tappe et al., 2016). De maneira importante, também foi reportado que existe uma maior produção de IL-17A e de IL-6, citocinas intimamente ligadas à função de linfócitos Th17, em mães infectadas pelo ZIKV que tiveram crianças diagnosticadas com SZC (Fialho, Veras, Jesus, et al., 2023). Além disso,

uma caracterização mais detalhada revelou uma maior proporção do subtipo Th1Th17 em mulheres grávidas infectadas pelo ZIKV, especialmente nos casos em que os recém-nascidos foram diagnosticados com SZC após o parto (Paiva et al., 2022). Os dados humanos também evidenciaram um aumento nos sinais de ativação celular, especialmente em monócitos, em mães de crianças com SZC (Fialho, Veras, de Jesus, et al., 2023). As crianças, por sua vez, apresentaram maior estresse oxidativo e uma porcentagem geral aumentada de monócitos, evidenciando um impacto a longo prazo em seu sistema imune (Fialho, Veras, de Jesus, et al., 2023). Alinhado a esses achados, foram encontradas citocinas relacionadas às respostas principalmente de linfócitos Th2, mas também de Th1 e Th17, em uma menor extensão, em amostras de casos de microcefalia fetal (Azevedo et al., 2018). Esses achados representam um ponto de partida crucial para associar a exposição pré-natal ao ZIKV com outros estudos da literatura que abordam a ativação do sistema imune materno, ou modelo MIA, e seus impactos nos descendentes.

Os dados discutidos nesta sessão evidenciam que o ZIKV tem o potencial de causar o desequilíbrio na resposta imune materna, mas pouco se sabe a contribuição desse processo para a patogênese do vírus nos descendentes. Além disso, enquanto o TEA apresenta uma maior prevalência em meninos, com uma razão de 4:1 em relação às meninas, a SZC, por outro lado, parece ter uma maior prevalência em meninas, embora mais evidências sejam necessárias para confirmar essa importante descoberta. Considerando que o ZIKV desencadeia um processo inflamatório tanto no lado materno quanto no compartimento fetal, surge um desafio central: Como estabelecer um modelo animal que dissocie os efeitos diretos do ZIKV no feto e os efeitos mediado pela ativação do sistema imune materno?

1.4 Aplicação de um modelo imunocompetente para estudar a influência da resposta imune materna na patogênese do ZIKV

Os estudos iniciais com o ZIKV demonstraram que, em modelos selvagens C57BL/6, a infecção por via intraperitoneal ou subcutânea resultava na eliminação da viremia pelos animais logo nos primeiros dois dias após a infecção (Corrêa et al., 2021). Para superar essa limitação, modelos mais invasivos foram desenvolvidos, como a infecção intracraniana, intraplacentária ou com alta carga viral administrada por via intravenosa (IV) (Q. H. Li et al., 2023). Contudo, a abordagem que se tornou predominante nos estudos publicados sobre o ZIKV foi o uso de camundongos imunossuprimidos, especialmente aqueles *knockouts* (KO) para o receptor de interferons do tipo I ou tipo II, conhecidos como IFNR-KO. Grande parte

do conhecimento atual sobre a infecção vertical e a patogênese geral do vírus deriva do uso desses modelos invasivos ou imunossuprimidos, o que cria um viés significativo ao tentar extrapolar esses dados para o contexto clínico real. Esse viés pode ser um dos motivos pelos quais ainda há uma lacuna na compreensão da dinâmica do ZIKV na interface materno-fetal. Camundongos imunossuprimidos alteram a interpretação das respostas imunes que poderiam desempenhar um papel crucial na patogênese. Além disso, a infecção intraplacentária interfere na dinâmica natural de transmissão do vírus do lado materno para o fetal, dificultando uma análise realista do processo de infecção. Essa situação destaca a necessidade de modelos experimentais que reflitam melhor as condições fisiológicas e imunológicas naturais para elucidar os mecanismos da infecção e patogênese do ZIKV na gestação.

Muito se discutiu acerca dos mecanismos envolvidos na falha em desenvolver viremia encontrada em modelos murinos imunocompetentes, levando a uma investigação mais detalhada das vias envolvidas nas respostas antivirais. As vias de interferon do tipo I e III (IFN-I e IFN-III) são fundamentais na resposta antiviral do hospedeiro. Estas podem ser ativadas pela detecção do RNA viral, seja por *toll-like receptors* (TLRs) localizados em compartimentos endocíticos, como o TLR3, ou por sensores citoplasmáticos, como o RIG-I e o MDA5, que detectam intermediários de RNA gerados momentaneamente durante a replicação viral (Duncan & Hambleton, 2021). Esses sensores ativam fatores de transcrição que induzem a produção de interferons (IFNs) (Bayer et al., 2016; Plataniias, 2005). Uma vez liberados, os IFNs se ligam aos seus receptores na superfície celular, desencadeando uma cascata de sinalização mediada pelas proteínas JAK, STAT1 e STAT2, junto com o IRF9. Essa interação forma o complexo *Interferon-Stimulated Gene Factor 3* (ISGF3), que é responsável por ativar a transcrição dos *genes estimulados por interferon* (ISGs), os quais produzem proteínas capazes de inibir a replicação viral (Schneider et al., 2014) (Ilustrado na figura 8). Nesse contexto, destaca-se um importante mecanismo de supressão da resposta antiviral gerada nas vias IFN-I e IFN-III causada pelo ZIKV, em que a proteína viral NS5 se liga a STAT2 e leva a sua degradação via proteassoma, ocasionando uma redução da produção de ISGs e, consequentemente, uma resposta antiviral menos eficiente (Kumar et al., 2016a). Esse mecanismo acontece em células humanas, mas não em células murinas, sendo este um dos motivos pelos quais camundongos selvagens possuem viremia limitada após infecção pelo ZIKV em laboratório.

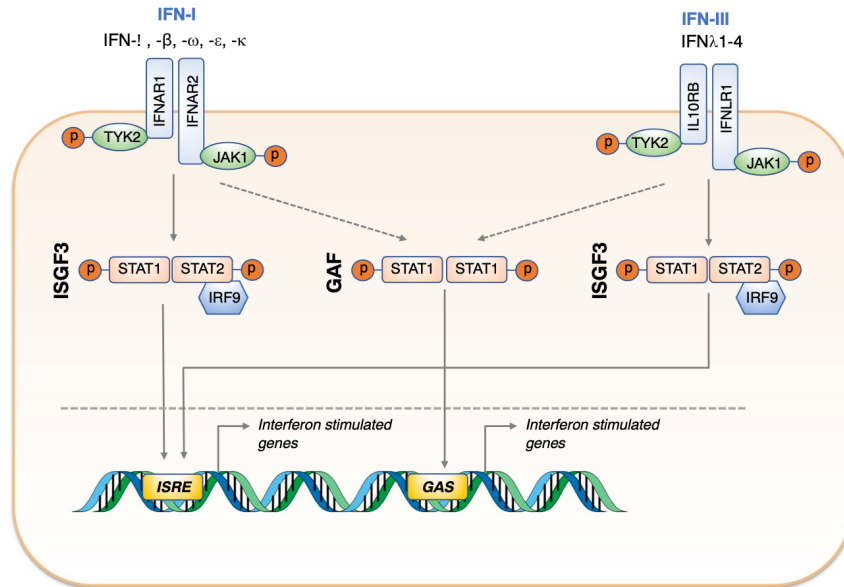


Figure 8: Ilustração da via de sinalização de IFN do tipo I e III. O STAT2 atua na indução de genes estimulados por interferon (ISGs) ao compor o complexo ISGF3 (fator 3 estimulado por interferon), juntamente com STAT1 e IRF9. Esse complexo transloca-se para o núcleo, onde promove a transcrição de ISGs envolvidos na resposta antiviral. Duncan and Hambleton, 2021. Journal of Clinical Immunology

Para enfrentar esse desafio, em 2018 foi publicado um modelo imunocompetente inovador para o estudo do ZIKV, desenvolvido pelo grupo de pesquisa liderado por Michael Diamond, na Washington University (Gorman et al., 2018). O modelo foi criado pela introdução do gene humano *STAT2* no locus *Stat2* murino, gerando camundongos *knock-in* (KI) imunocompetentes que expressam a proteína STAT2 humana em substituição à murina. Utilizando esse modelo, foi possível observar uma viremia moderada e disseminação do vírus para o compartimento placentário por meio de infecção subcutânea, sem ocorrência de casos letais (Gorman et al., 2018). Esse avanço permite o uso de um modelo animal mais representativo da forma como o ZIKV causa viremia e disseminação em humanos. Além disso, o modelo apresenta o potencial de gerar dados mais robustos e translacionais sobre a infecção vertical e as respostas imunológicas desencadeadas pelo ZIKV. Considerando esses aspectos, este foi o modelo escolhido para o presente estudo, o qual visa elucidar novos mecanismos e preencher as lacunas existentes sobre o impacto do ZIKV na dinâmica da interface materno-fetal, bem como investigar a contribuição da ativação do sistema imune materno para a patogênese na prole. A partir de um esquema de cruzamento que será descrito em tópicos posteriores, foi possível gerar uma prole suscetível ou resistente ao vírus, que se desenvolveram

em ambientes expostos à resposta imune materna ou protegidos dela, entendendo assim a contribuição dessa resposta para a patogênese do ZIKV nos descendentes, além do seu impacto direto na transmissão vertical.

2. Justificativa

Após uma década da epidemia de ZIKV no Brasil, a transmissão vertical e o desenvolvimento da síndrome congênita do Zika (SCZ) têm sido amplamente explorados na literatura. Contudo, muitas crianças expostas ao vírus durante a gestação, embora não apresentem anomalias congênitas detectáveis ao nascimento, podem estar sob risco de desenvolver consequências tardias. Evidências crescentes sugerem que a inflamação pré-natal, desencadeada por infecções como a causada pelo ZIKV, tem o potencial de impactar o desenvolvimento fetal, mesmo na ausência de sinais clínicos evidentes ao nascimento. O cérebro em desenvolvimento é particularmente sensível a alterações no ambiente intrauterino, tornando os processos inflamatórios gestacionais um fator de risco relevante, com possíveis repercussões ao longo da vida. Como o ZIKV é capaz de induzir inflamação tanto no lado materno quanto no compartimento fetal, torna-se essencial investigar os impactos dessa inflamação sobre a prole. Considerando que a infecção vertical ocorre em apenas uma pequena parcela dos casos, o papel de fatores maternos, especialmente da resposta imune, ganha destaque na modulação da patogênese viral durante a gestação. Para avançar nessa compreensão, é indispensável o uso de modelos experimentais que permitam distinguir entre os efeitos diretos do vírus e aqueles mediados pela ativação imune materna. Nesse contexto, o ZIKV se apresenta como uma possível ferramenta experimental promissora para o estudo dos efeitos da inflamação gestacional sobre o neurodesenvolvimento. Avaliar o ZIKV sob essa nova perspectiva contribuiria não apenas para aprofundar o entendimento da sua patogênese, mas também para enriquecer a literatura sobre o modelo de MIA, ampliando o escopo das infecções virais com potencial impacto duradouro sobre a saúde da prole.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a resposta imune materna induzida pelo ZIKV na interface materno-fetal e seus efeitos a longo-prazo no neurodesenvolvimento da prole

3.2 Objetivos específicos

3.2.1) Estabelecer um modelo experimental em camundongos que possibilite a comparação entre progênes geradas em ambientes maternos distintos.

3.2.2) Determinar as respostas imunes no organismo materno, na interface materno-fetal e no organismo fetal, durante exposição ao ZIKV na gestação, utilizando o modelo experimental previamente estabelecido, avaliando:

- a carga viral do soro materno;
- o perfil de citocinas por ELISA do soro materno;
- o perfil de imunofenotipagem no baço e linfonodo drenante materno;
- o perfil de imunofenotipagem e expressão gênica na decídua e placenta;
- a carga viral e citocinas do fluido amniótico;
- a expressão gênica do cérebro fetal.

3.2.3) Determinar as respostas imunes e alterações comportamentais após o nascimento das progênes expostas ao ZIKV durante a gestação, com base no modelo experimental previamente estabelecido, avaliando:

- a carga viral do soro;
- o comportamento neonatal através das vocalizações ultrassônicas;
- o perfil de imunofenotipagem no baço;
- a carga viral e expressão de genes-alvo cérebro.

4. Metodologia

4.1 Acondicionamento e manejo dos animais

Os camundongos C57/BL6 hSTAT2 KI foram obtidos da Washington University (Gorman et al., 2018). Foram mantidos a 23 ± 1 ° C em ciclo de luz/escuro de 12

horas, com livre acesso à comida, na HCCM Facility, da *Harvard Medical School*. Animais *Wild Type* (WT) foram obtidos da *Jackson Laboratory*, e mantidos nas mesmas condições citadas. Todos os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) e estão descritos no Protocolo de Uso Animal, de número IS00001676-6, pertencente ao Investigador Principal Jun R Huh.

4.2.Experimentação *in vivo*

4.2.1 Delineamento para obtenção do modelo experimental proposto

Camundongos de 8-12 semanas foram transferidos para o nível de biossegurança NB2 e mantidos a 23 ± 1 ° C em ciclo de luz/escuro de 12 horas, com livre acesso à comida, na HCCM. Diferentemente de seus homólogos murinos, os camundongos que expressam hSTAT2 são suscetíveis ao ZIKV. Para limitar os efeitos do ZIKV na barreira placentária, cruzamos fêmeas C57/BL6 do tipo selvagem (WT), tipicamente conhecidas por serem resistente ao vírus, com machos hSTAT2 KI homozigotos, com o objetivo de obter camundongos que expressem a proteína hSTAT2 nos tecidos de origem fetal, incluindo a placenta, mas não nas mães. Com este desenho experimental, poderemos focar na inflamação induzida pelo ZIKV no lado placentário, em vez do lado materno, investigar seu impacto no desenvolvimento da prole (Ilustrado como grupo 1, da Figura 9A). Inversamente, cruzamos fêmeas heterozigotas hSTAT2KI, que expressam hSTAT2, com machos WT (Ilustrado como grupo 2, da Figura 9A). Como essas fêmeas são heterozigotas e cada feto em um camundongo gestante possui seu próprio compartimento fetal, a ninhada resultante apresentará uma mistura: alguns fetos e suas respectivas placentas (derivadas do genótipo fetal) serão hSTAT2KI heterozigotos, enquanto outros fetos e placentas serão WT, coexistindo na mesma mãe suscetível (Ilustrado como grupo 2, da Figura 9A e genotipagem representada em 9B). Como controle, fizemos o cruzamento de fêmeas WT com machos WT, um modelo tipicamente descrito como resistente ao vírus (Ilustrado como grupo 3, na Figura 9A). O acasalamento dos camundongos foi feito sempre ao final do dia, por volta das 17h. Na manhã seguinte é possível observar que as fêmeas que acasalaram apresentam um *plug* vaginal viscoso, provenientes de componentes do ejaculado masculino. Com isso, as fêmeas que apresentaram a estrutura no canal vaginal foram separadas, e mantidas até o dia E10.5, momento em que gravidez pode ser constatada. Fêmeas gestantes seguiram para a etapa de infecção, enquanto as fêmeas não-gestantes retornaram para um novo ciclo de acasalamento.

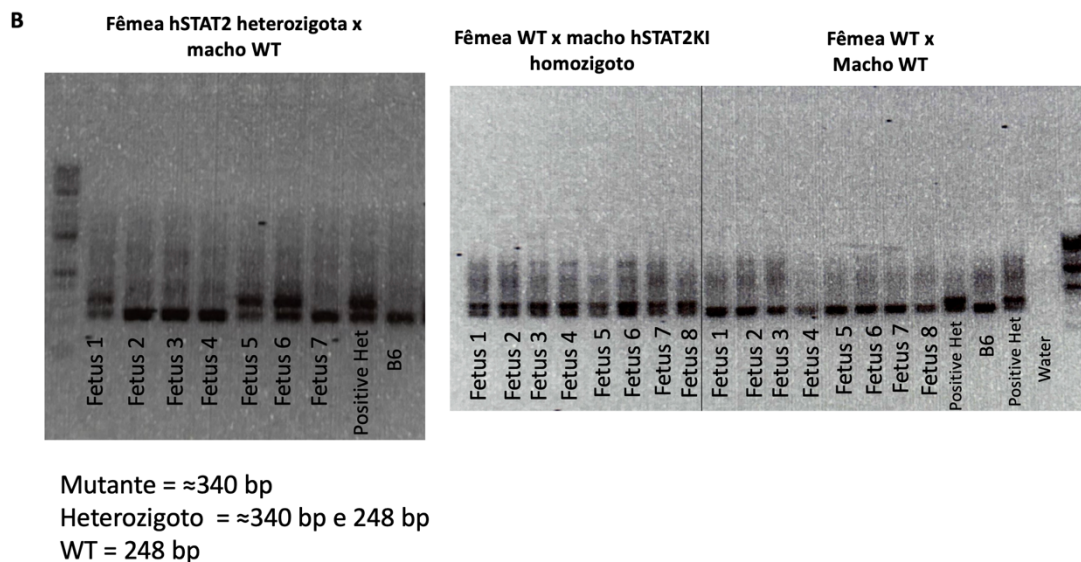
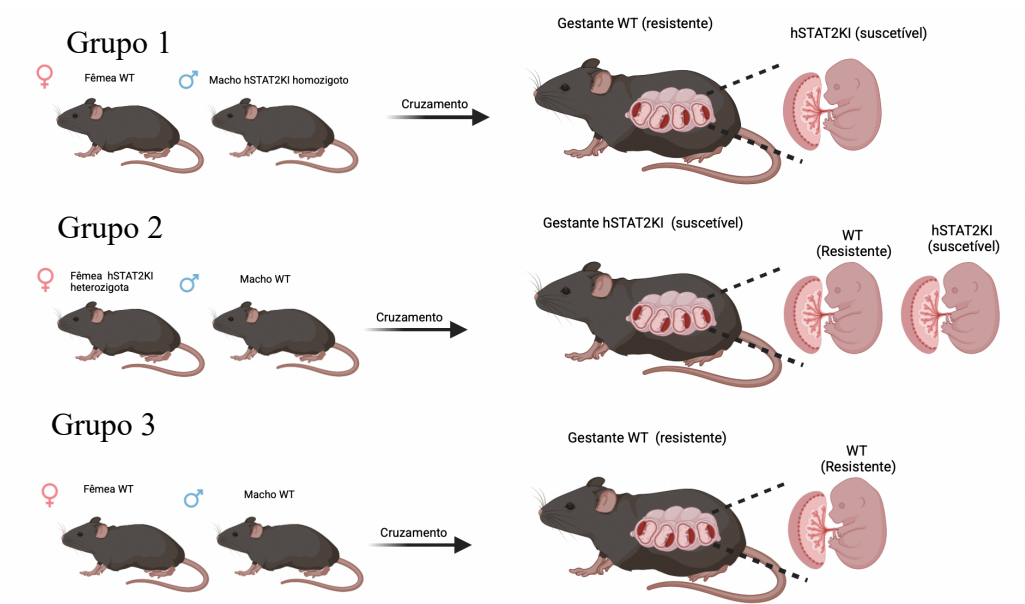


Figura 9: Esquema de cruzamento aplicado no modelo experimental (A) *made by Biorender*; Resultado da genotipagem para o gene *STAT2*, com a banda superior correspondendo à versão humana e a banda inferior à versão murina (B). A presença de ambas as bandas indica um animal hSTAT2KI heterozigoto, enquanto a presença apenas da banda inferior caracteriza um animal selvagem (WT). Controles positivos de animais heterozigotos (referidos como positive het) e WT (referidos como B6) foram utilizados para comparação.

4.2.2 Infecção de camundongos durante a gestação e coleta de tecidos

No dia embrionário 10.5 (E10.5) as fêmeas grávidas foram infectadas pela via subcutânea com 5.10^4 *plaque forming units* (PFU) PFU/mL do isolado de Porto Rico PRVABC59 (GenBank KU501215). Fêmeas grávidas, não-infectadas, foram injetadas com o mesmo volume de sobrenadante de células Vero não-infectadas, conhecido como *Mock*, sendo este utilizado como controle em experimentos iniciais. As fêmeas infectadas foram

monitoradas diariamente até o dia E17.5, correspondente ao sétimo dia pós-infecção, momento estabelecido para a eutanásia e realização das análises relacionadas ao período gestacional. Para a análise da prole após o nascimento, foi verificado o dia exato do parto, e os filhotes foram mantidos com a mãe, sendo ambos monitorados diariamente até o 9º dia ou 4 semanas após o nascimento, a depender da análise. As fêmeas grávidas foram eutanasiadas no E17.5, e a coleta de baço, linfonodo drenante, decídua, fluido amniótico, placenta e tecidos fetais foi executada com a maior agilidade possível, para que os tecidos permanecessem viáveis para a citometria de fluxo após processamento. O fluido amniótico foi coletado perfurando cuidadosamente o saco amniótico com uma agulha fina, e aspirando o líquido com a seringa, trocando os utensílios para cada um dos fetos e transferindo o volume coletado para um seu respectivo tubo *eppendorf* previamente identificado. Esse procedimento foi feito anteriormente ao passo processar o tecido fetal e coletar a placenta. O linfonodo e baço foram mantidos em HBSS (sem cálcio e magnésio) a 4°C até o momento do processamento, enquanto a placenta e decídua foram mantidos em meio RPMI (Gibco) a 4°C. Tecidos utilizados apenas para PCR quantitativa em tempo real (qPCR), como o cérebro, foram transferidos diretamente para 1ml de TRIzol após a coleta, e congelados a -80°C em seguida.

4.2.3 Coleta de sangue

Fêmeas grávidas tiveram seu sangue coletado nos dias 2 e 7 após a infecção, sendo, respectivamente, os dias E12.5 e E17.5 da gestação, através da coleta minimamente invasiva pela veia facial, localizada na região submandibular. As amostras foram acondicionadas em microtubos com EDTA 10% (m/v) e centrifugadas à 2000G, por 10min a 4°C para separação do plasma. O plasma obtido foi coletado e armazenado a -80°C, e posteriormente utilizado para análise de carga viral ou detecção de citocinas.

4.2.4 Extração de RNA de soro e tecido e qPCR

Para análise de carga viral do plasma ou fluido amniótico, foram utilizados 50µl de amostra e o RNA foi isolado através do procedimento descrito para o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Os tecidos, por sua vez, foram homogeneizados utilizando um homogeneizador de tecidos (Omni TH, Thomas Scientific), em 1mL de TRIzol a cada 50ug de tecido, e centrifugado em 12000G a 4°C, por 15 minutos. Posteriormente o RNA foi isolado pela adição de clorofórmio, precipitado com isopropanol e lavado com uso de Etanol a 75%, de acordo com os volumes recomendados pelo fabricante do TRIzol *Reagent*. O RNA foi eluído em 50µL

de água livre de RNase. A concentração de RNA foi estimada usando 1µL de amostra, analisada no NanoDrop Microvolume Spectrophotometers (ThermoFisher Scientific).

Transcrição Reversa: Aliquotas contendo 1µg de RNA foram preparadas com 4 µL de master mix e 1µL de transcriptase reversa (ambos do kit Bio-Rad iScript™ cDNA Synthesis Kit). Água livre de nucleases foi adicionada para atingir um volume total de 20µL. Reação: 25°C por 5 minutos; 46°C por 20 minutos; 95°C por 1 minuto. Para PCR quantitativo, o cDNA foi diluído com água para uma concentração de 20ng/µL.

qPCR: Para cada poço da placa de 384 poços, foram misturados 5 µL de master mix iTaq Universal SYBR (Bio-Rad), 3,5 µL de água, 0,25 µL de primer *forward*, 0,25 µL de primer *reverse* e 1 µL de cDNA. Ciclo de PCR: 60°C por 1 minuto, seguido por aumento gradual para 95°C (1,6°C/s); 95°C por 15 segundos, seguido por redução gradual para 60°C (1,6°C/s). O ciclo foi repetido 40 vezes. Após os 40 ciclos, a curva de melting foi gerada com aumento gradual da temperatura de 60°C a 96°C a uma taxa de 0,075°C/s. Os primers foram projetados utilizando a ferramenta de qPCR disponível na plataforma online da Integrated DNA Technologies (IDT). Em seguida, as sequências foram verificadas no banco de dados do NCBI para confirmar sua compatibilidade com o gene-alvo e adequação para a análise de expressão gênica. Após a validação, os primers foram encomendados diretamente da IDT e diluídos em água para uma concentração final de 10µM. Para calcular a expressão relativa dos genes, os valores de CT do gene de referência GAPDH foram utilizados como normalizadores. A expressão relativa foi determinada pelo método do $\Delta\Delta CT$ (delta-delta CT), que compara as diferenças de expressão gênica entre as amostras experimentais e o controle, normalizando contra o gene de referência. Os resultados foram apresentados como a razão da expressão relativa (*fold change*), refletindo o aumento ou redução da expressão do gene-alvo em relação ao controle experimental.

4.3.5 Quantificação de citocinas do plasma e fluido amniótico

O plasma e o fluido amniótico, em um volume de 25µL para cada citocina, foram utilizados para dosagens de IL-6, IL-1β e TNF-α utilizando-se kits comerciais ELISA MAX™ Deluxe Set (BioLegend). As instruções do fabricante foram seguidas e os níveis de citocinas foram apresentados em pg/mL.

4.3.6 Isolamento de células imunes dos tecidos

Linfonodo e baço: O linfonodo e baço foram processados colocando-os sobre um filtro de 70µm previamente umedecido com HBSS gelado, posicionado sobre um tubo falcon de 50mL. Os tecidos foram mecanicamente processados usando a parte traseira de uma seringa de 3mL, lavados duas vezes com HBSS. A suspensão resultante foi centrifugada a 450G por 10 minutos. As células provenientes do baço passaram pela etapa de lise de células vermelhas, utilizando 1ml o tampão ACK de lise (ThermoFisher Scientific) por 1min, posteriormente diluído com 5mL de HBSS gelado. Após a centrifugação para remoção do tampão AKC, as células são então lavadas com HBSS, ressuspensas e transferidas para uma placa de 96 poços, com fundo em formato U para imunomarcção por citometria de fluxo.

Placenta: A placenta e a decídua, separadamente, passaram por digestão do tecido com uso de Liberase (1:100) e DNase (1:100), diluídos em meio RPMI com 2% de SFB, a 37°C, em um agitador de rotação de 250rpm por 45 minutos. Após a digestão, o sobrenadante é coletado e passado por um filtro de 100 µm previamente umedecido com HBSS. O filtro retém os fragmentos que não foram completamente digeridos, os quais foram dissociados mecanicamente sobre o filtro. As células coletadas passaram pela etapa de lise de células vermelhas, utilizando o tampão ACK de lise, diluídas com 10mL de HBSS gelado para inativação da reação, seguido de centrifugação a 450G por 5min. Após centrifugação e lavagem, as células totais coletadas dos tecidos passaram por um gradiente de Percoll de 40%, seguido de centrifugação a 860G à temperatura ambiente por 20 minutos, com aceleração e desaceleração em zero. Após a centrifugação, é possível observar a interfase caracterizada por uma camada esbranquiçada circular, a qual contém as células imunes isoladas do tecido total. A interfase foi coletada com o auxílio de uma pipeta Pasteur de 3ml, e misturada com meio RPMI para lavagem. Após nova lavagem com HBSS, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços com fundo em U, e seguiram para a etapa de imunomarcção para citometria de fluxo.

4.2.7 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As células imunes isoladas de diferentes tecidos foram marcadas utilizando painéis específicos, selecionados de acordo com os alvos propostos em cada experimento. O procedimento detalhado foi realizado conforme descrito no protocolo publicado por Kim et al., 2022 (E. Kim, Tran, et al., 2022). De forma geral, para a marcação de superfície, o coquetel foi composto por HBSS (sem cálcio e magnésio), usado para diluir os anticorpos que estão em

uma concentração final de 1:200, contendo também o marcador de células mortas LIVE/DEAD *Fixable Aqua Dead Cell stain kit* (ThermoFisher Scientific) em uma concentração de 1:500, e o bloqueador da porção Fc Rat anti-mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™) (Clone ID 2.4G2), com tempo de incubação de 1 hora a 4°C. Para marcação intracelular, utilizamos o kit para marcação de fatores de transcrição (eBioscience™ Foxp3/ThermoFisher Scientific), com o qual as células foram fixadas por 30 minutos, a temperatura ambiente, utilizando o reagente de fixação proveniente no kit, seguidas de permeabilização, utilizando o tampão de permeabilização, diluído para a concentração de trabalho (1X) em água destilada. O coquetel para marcação intracelular foi feito com os anticorpos em uma diluição de 1:100, com tempo de incubação de 1 hora a 4°C. Após marcação com os anticorpos, as células foram lavadas com tampão e as análises de citometria foram executadas no BD FACSymphony™ A1 Cell Analyzer. O painel de marcação e o esquema de *gating*, desenvolvidos no FlowJo Version 10 para análise da placenta (Figura 10), baço (Figura 11) e linfonodo (Figura 12).

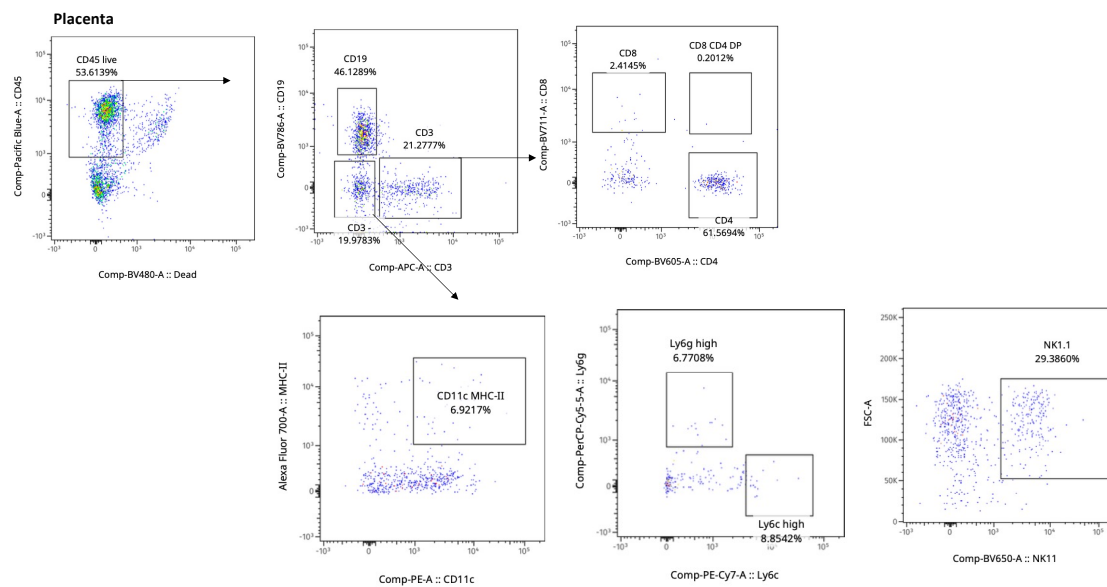


Figura 10: Painel de imunofenotipagem aplicado para às células imunes isoladas da placenta de camundongos infectados com ZIKV. As células vivas foram distinguidas usando LIVE/DEAD™ Aqua (BV480), seguido do *gating* para células CD45⁺ (PB). A porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ foi avaliada pelo *gating* de células CD3⁺ e CD19⁻. O painel de células inatas, como APCs (CD11c⁺ MHC-II⁺), neutrófilos (Ly6C^{low}Ly6G^{high}) e células NK (NK1.1⁺) foi obtido através do *gating* de células CD3⁺CD19⁻.

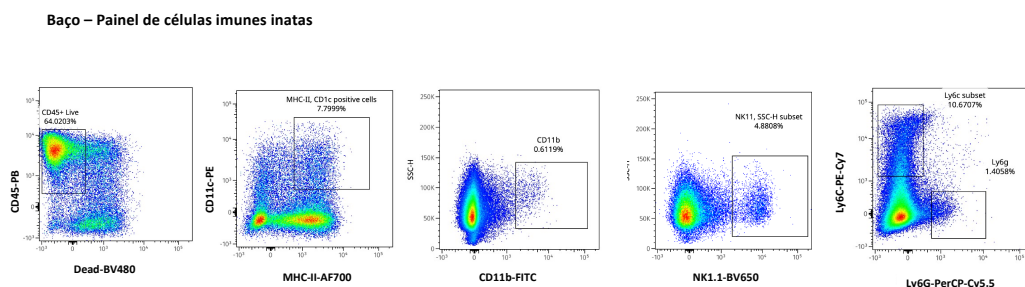
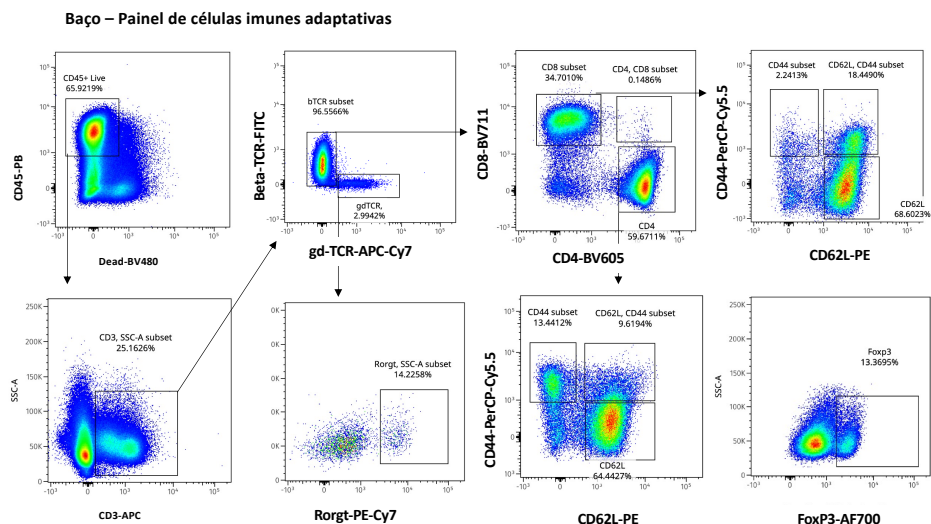


Figura 11: Pannel de imunofenotipagem aplicado às células isoladas do baço de camundongos infectados com ZIKV. As células vivas foram distinguidas usando LIVE/DEAD™ Aqua (BV480), seguido do *gating* para células CD45⁺ (PB). Para o pannel de células imunes adaptativas, a partir do *gating* em células CD3⁺, foi realizando o *gating* com base na expressão do receptor de linfócito T (TCR), sendo a população αβTCR⁺ e γδTCR⁺. A porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ foi avaliada a partir do *gating* em αβTCR⁺. A porcentagem de linfócitos efetores (CD44^{high} CD62L^{low}) foi avaliada através do *gating* de células CD4⁺ ou CD8⁺. A porcentagem de células FoxP3⁺ foi avaliada através do *gating* em células CD4⁺. A porcentagem de células RORγt⁺ foi avaliada a partir do *gating* em γδTCR⁺. O pannel de células inatas, como APCs (CD11c⁺ MHC-II⁺), células mieloides (CD11b⁺), neutrófilos (Ly6C^{low} Ly6G^{high}) e células NK (NK1.1⁺) foi obtido através do *gating* de células CD3⁺.

Linfonodo

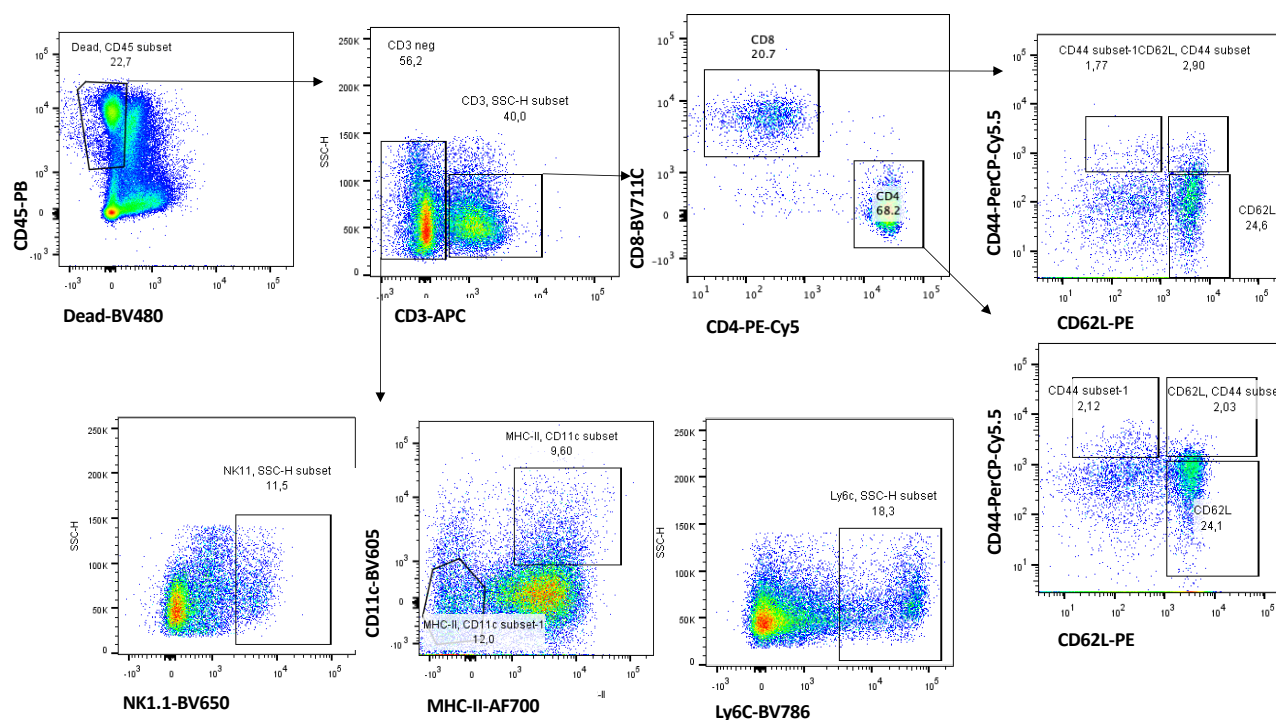


Figura 12: Pannel de imunofenotipagem aplicado às células isoladas do linfonodo de camundongos infectados com ZIKV. As células vivas foram distinguidas usando LIVE/DEAD™ Aqua (BV480), seguido do gating para células CD45⁺ (PB). Para o pannel de células imunes adaptativas, a partir do gating em células CD3⁺, a porcentagem de linfócitos efetores (CD44^{high} CD62L^{low}) foi avaliada através do gating de células CD4⁺ ou CD8⁺. O pannel de células inatas, como APCs (CD11c⁺ MHC-II⁺), monócitos (Ly6C⁺) e células NK (NK1.1⁺) foi obtido através do gating de células CD3⁺.

4.2.8 Ensaio de vocalizações ultrassônicas

No 9º dia após o nascimento, as vocalizações ultrassônicas (USVs) dos filhotes de camundongos foram detectadas durante 3 minutos utilizando um microfone *Ultra-Sound Gate* CM16/CPMA (AviSoft) e o *software* SAS Prolab (AviSoft) em uma câmara com isolamento acústico e temperatura estável (19–22 °C). Para a caracterização das USVs, os sonogramas do primeiro minuto das gravações foram analisados quanto ao número total de chamadas realizadas e à duração média das chamadas. O espectrograma representativo de vocalizações ultrassônicas emitidas por filhotes, publicados no trabalho referência para o presente experimento (Shin Yim et al., 2017), estão presentes na Figura 13, no qual o PBS representa o grupo controle, enquanto E12.5 representa animais expostos à inflamação materna no dia E12.5, demonstrando o padrão aumentado de vocalizações em resposta a distúrbios durante o processo gestacional.

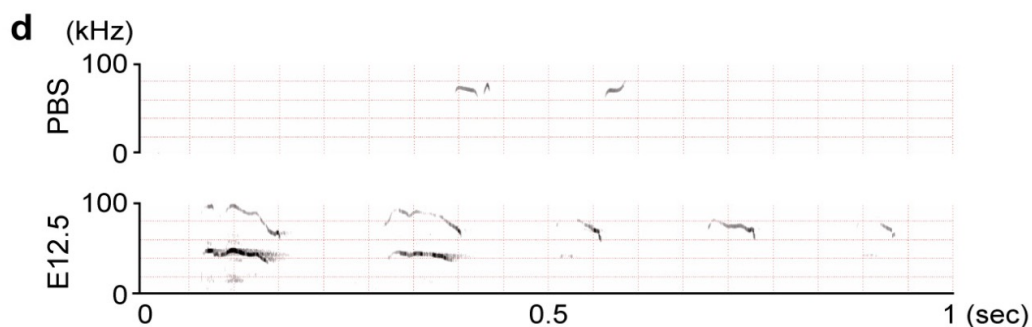


Figure 13: Espectrogramas representativos das vocalizações ultrassônicas (USVs) emitidas por filhotes dos grupos PBS e E12.5. O índice USV representa o número total de vocalizações emitidas pelos filhotes. Adaptado de Yim et al., 2017. Nature

4.3 Análises estatísticas

Para verificar a normalidade dos dados, foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal (paramétricos) foram analisados utilizando o teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Para os dados sem distribuição normal (não-paramétricos), foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, com o pós-teste de Dunn. Os gráficos foram gerados no software GraphPad Prism 10.0.

5. Resultados

5.1 Resposta imune diferencial de fêmeas grávidas infectadas com ZIKV

Com o objetivo de caracterizar e compreender a influência da resposta imune materna na patogênese do ZIKV na prole, buscamos criar ambientes gestacionais distintos: um exposto à inflamação materna e outro protegido dessa condição. Dessa forma, investigamos se a inflamação materna atua como um fator contribuinte para os efeitos do ZIKV no compartimento fetal e para os desdobramentos após o nascimento. O esquema de cruzamento utilizado para alcançar esse objetivo foi detalhado na seção de metodologia 4.2.1 e ilustrado na Figura 9. Resumidamente, geramos uma prole que expressa hSTAT2 nos tecidos de origem fetal, incluindo a placenta, tornando-os possivelmente suscetíveis à infecção pelo ZIKV, mas desenvolvidos em uma fêmea WT, resistente à infecção. Para efeito de comparação, uma fêmea hSTAT2KI heterozigota, suscetível à infecção, foi acasalada com um macho WT, resultando em uma prole que pode ser WT ou hSTAT2KI, coexistindo na mesma mãe. O primeiro passo para validar o desenho experimental proposto é avaliar se as fêmeas gestantes apresentam de fato um processo inflamatório distinto em resposta à infecção pelo ZIKV. Considerando esse aspecto, a carga viral foi avaliada do soro das fêmeas gestantes no 7º dia pós-infecção (dpi) (Figura 14A). Os dados indicaram que, em 7 dpi, a viremia já é indetectável em fêmeas WT acasaladas com WT, conforme relatado na literatura para esse modelo, conhecido por sua resistência à infecção. Como esperado, as fêmeas hSTAT2KI apresentaram uma carga viral significativa, confirmando a funcionalidade do modelo experimental. Curiosamente, a fêmea WT acasalada com um macho hSTAT2KI mostrou uma carga viral detectável, embora aproximadamente cinco vezes menor que a das fêmeas suscetíveis, mas ainda superior à das fêmeas provenientes do cruzamento WTxWT. Isso nos levou a levantar a hipótese de que as placentas dessa fêmea, que expressam hSTAT2, poderiam estar positivas, contribuindo para uma viremia baixa na mãe. Essa possibilidade será explorada em tópicos posteriores.

A produção de citocinas no plasma das fêmeas grávidas também foi avaliada 2dpi, com a inclusão do grupo *mock*, na intenção de compará-lo ao modelo que chamamos aqui de resistente (cruzamento WTxWT). Observou-se uma produção significativamente maior de IL-6 (Figura 14B) e IL-1 β (Figura 14C) nas fêmeas hSTAT2KI em comparação aos controles Mock e WTxWT. Por outro lado, apenas a produção de IL-6 mostrou-se estatisticamente aumentada quando comparada à das fêmeas provenientes do cruzamento WTxhSTAT2KI,

apesar do padrão de aumento observado. Não foram observadas diferenças estatísticas entre o *mock* e as fêmeas do cruzamento WTxWT.

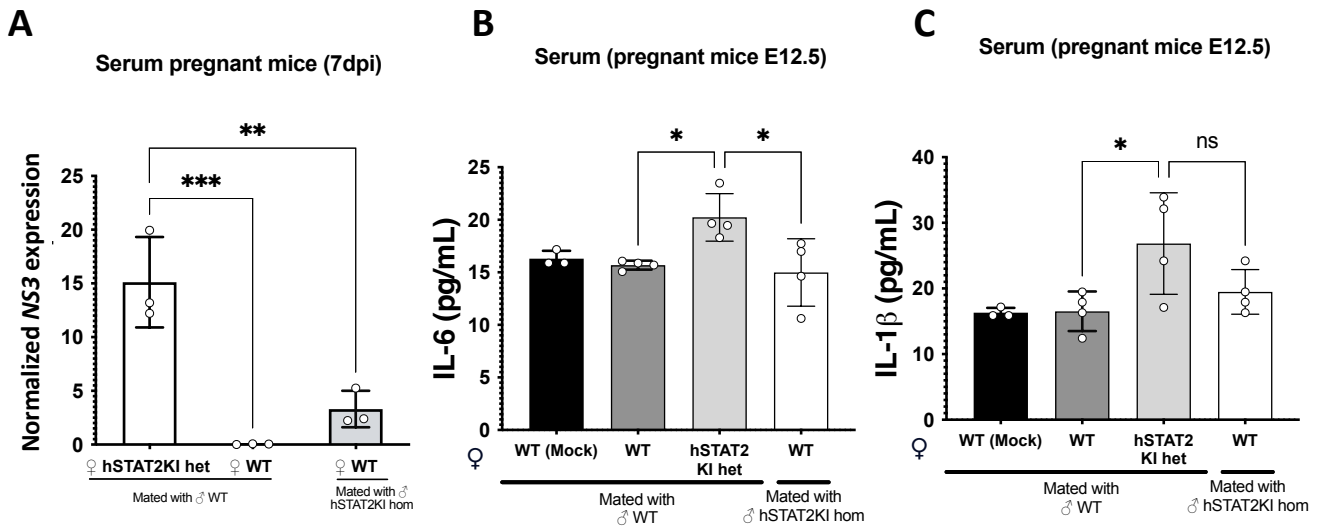


Figura 14: Fêmeas grávidas hSTAT2KI apresentam maior carga viral e marcadores inflamatórios no sangue. Fêmeas grávidas foram infectadas no dia E10.5. A detecção de RNA viral foi realizada por qPCR 7dpi (a), e as citocinas IL-6 e IL-1β foram quantificadas por ELISA (b e c) a partir do plasma de fêmeas grávidas infectadas 2 dpi, correspondente ao dia E12.5. Os dados foram analisados por ANOVA, seguidos do test post hoc de Tukey, para análises múltiplas. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Prosseguindo com as análises imunológicas do lado materno, realizamos uma imunofenotipagem do baço 7 dpi, correspondendo ao dia E17.5. Para avaliar o perfil de ativação das células T $CD4^+$ e $CD8^+$, foi considerada a população $CD44^+CD62L^-$ (esquema de *gating* na Figura 11), que comumente caracteriza células T efectoras ou efectoras de memória. O marcador CD44 é uma molécula envolvida no tráfego celular e na interação com a matriz extracelular, apresentando alta expressão em células T ativadas e baixa expressão em linfócitos T naïve. Por outro lado, CD62L é uma molécula de adesão responsável pelo *homing* de células T aos órgãos linfoides, sendo altamente expressa em células T naïve para facilitar sua entrada nesses órgãos, mas exibindo baixa ou ausente expressão em células T efectoras (Nakajima et al., 2021). Ao analisar a ativação de células T, observamos um aumento de 1,5 vezes na porcentagem de células $CD8^+$ efectoras no baço de fêmeas hSTAT2KI, em comparação com as fêmeas WT de ambos os cruzamentos (Figura 15A). Por outro lado, não foram identificadas diferenças significativas na população de células $CD4^+$ (Figura 15B). Adicionalmente, ao avaliar a porcentagem de células $CD4^+FoxP3^+$, classificadas como células T regulatórias (Tregs), detectamos um aumento nas fêmeas hSTAT2KI em relação às WT (Figura 15C). Este achado sugere um mecanismo natural de imunorregulação, possivelmente para prevenção de

uma resposta exacerbada das células T frente à exposição viral. Curiosamente, ao avaliar células RORγt+, selecionadas do *gating* CD3+ γδTCR+, observamos uma porcentagem 2 vezes menor de células positivas em fêmeas hSTAT2KI comparada à ambas as fêmeas WT (Figura 15D), contudo, os mecanismos envolvidos nessa redução ainda não estão claros no presente modelo.

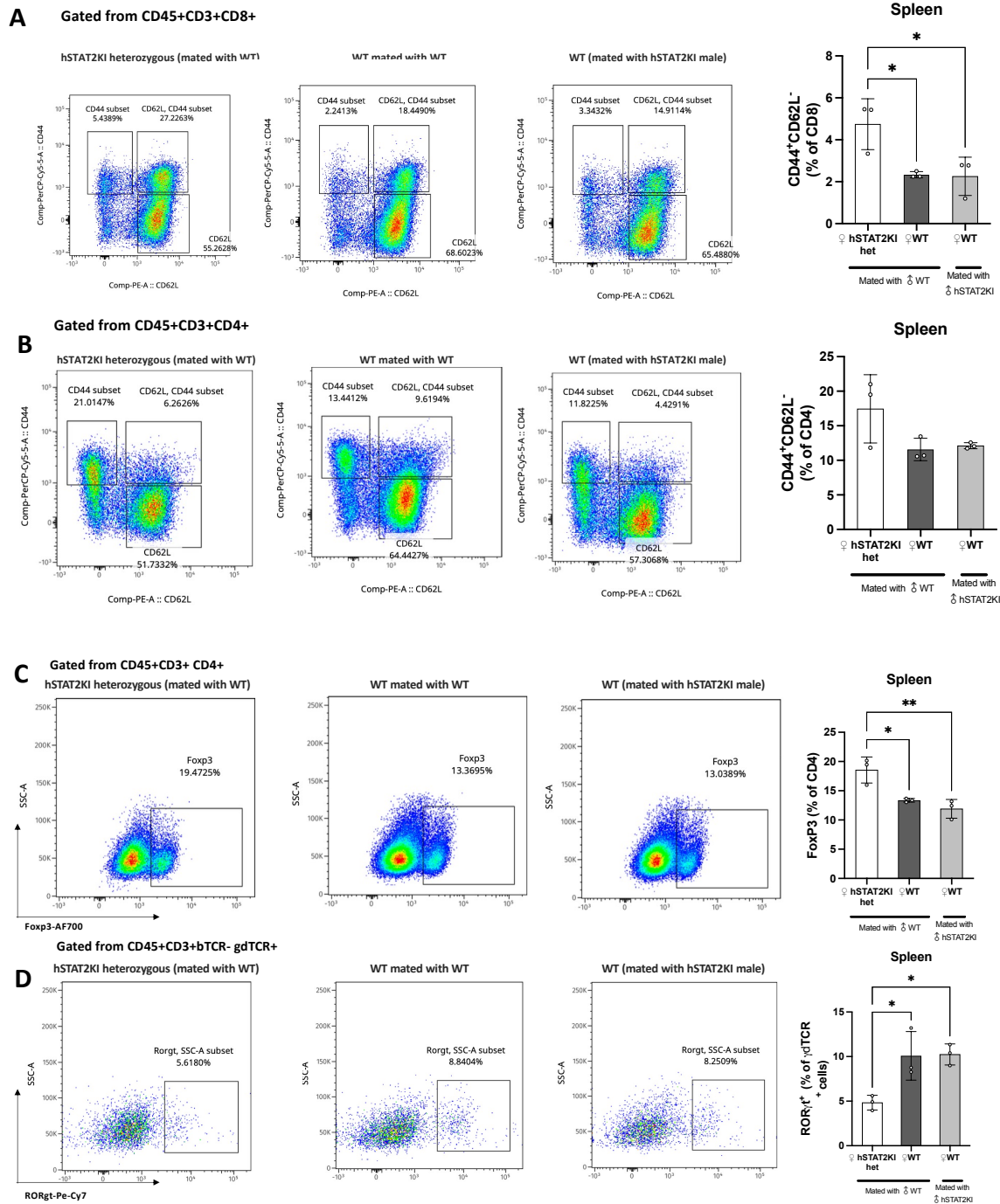


Figure 15: Imunofenotipagem do baço entre fêmeas grávidas infectadas com ZIKV. Fêmeas grávidas foram infectadas no dia E10.5. O baço foi coletado e processado 7dpi, seguido pela caracterização das populações de células imunes utilizando o FACS Symphony A1. As células vivas foram diferenciadas usando LIVE/DEAD™ Aqua, seguido pelo *gating* para células CD45 positivas (a-d). Os dados foram

de uma maior carga viral. O esquema experimental utilizado neste estudo, baseado nesse cruzamento, ainda não foi explorado na literatura, deixando em aberto como a prole proveniente desses ambientes inflamatórios distintos durante a gestação se comportará. Dessa forma, questões importantes emergem, como: A prole hSTAT2KI gerada por uma fêmea WT, que apresenta inflamação e carga viral atenuadas, ainda seria suscetível ao ZIKV? A prole WT gerada por uma mãe hSTAT2KI, ao ser exposta a um ambiente inflamatório durante a gestação, permaneceria resistente ou poderia ser afetada? Para abordar essas questões, foi realizada uma análise detalhada do perfil inflamatório na interface materno-fetal, bem como das características da prole. Os resultados dessas análises serão descritos nos tópicos subsequentes.

5.2. Aumento da inflamação em placentas de camundongos hSTAT2KI de mães suscetíveis

Após caracterizar o perfil inflamatório materno, avançamos para a análise da placenta, com o objetivo de começar a desvendar como a prole poderia ser afetada pela infecção pelo ZIKV e pela exposição à inflamação materna. Para isso, infectamos fêmeas gestantes no dia E10.5 e coletamos as placentas 7dpi, correspondendo ao dia E17.5. O genótipo das placentas e a sexagem fetal, realizada pela expressão do gene SRY, foram avaliados por PCR convencional para cada placenta e tecido fetal coletado em cada experimento. A análise do peso das placentas revelou que não houve alterações significativas neste parâmetro em nenhum dos grupos avaliados (Figura 17A). Surpreendentemente, ao avaliarmos a carga viral, constatamos que as placentas de genótipo hSTAT2KI, provenientes de mães suscetíveis ou resistentes, apresentaram níveis equivalentes de carga viral (Figura 17B). Esses dados indicam que o ZIKV possui capacidade de infectar e se replicar no compartimento fetal desde que este seja suscetível, independentemente da suscetibilidade materna. Por outro lado, as placentas de genótipo WT, provenientes de mães resistentes (WT) ou suscetíveis (hSTAT2KI), exibiram baixa ou nenhuma carga viral detectável. Curiosamente, mesmo em um ambiente em que a mãe hSTAT2KI apresenta viremia detectável no plasma 7dpi, a placenta WT foi capaz de controlar a infecção, mantendo níveis virais praticamente indetectáveis no compartimento fetal nesse mesmo período. Para compreender a dinâmica inicial da infecção e investigar se a ausência de carga viral em placentas WT aos 7dpi resulta de um controle mais eficiente da infecção ou da incapacidade do vírus de infectar o tecido, também avaliamos a carga viral em 1dpi (Figura 17C). Os resultados corroboram nossa hipótese inicial: as placentas WT apresentam uma infecção inicial pelo ZIKV em menor intensidade em comparação às placentas hSTAT2KI. No entanto, aos 7dpi, as placentas WT conseguem controlar efetivamente a viremia, enquanto as

placentas hSTAT2KI mantêm níveis similares de viremia, evidenciando sua menor capacidade de controlar a replicação viral.

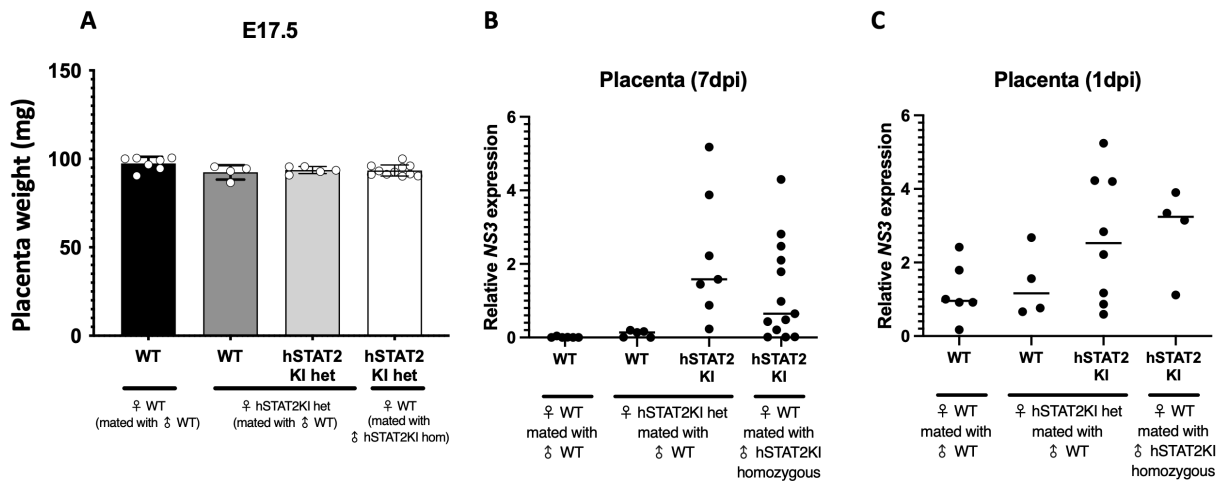


Figure 17: Análise de carga viral de placentas após 7 dias de infecção com ZIKV durante a gestação. As fêmeas grávidas foram infectadas no E10.5, e 7dpi, as placentas foram coletadas para análise do peso do tecido (a) e RNA viral (b e c). A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com os fatores “genótipo fetal” e “genótipo materno”, seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Com base nos resultados de carga viral, avaliamos a expressão do *IFITM3*, um importante gene estimulado por interferon (*interferon-stimulated gene* – ISG), nas placentas aos 7dpi (Figura 18A). Conforme esperado, as placentas com genótipo WT apresentaram maior expressão de IFITM3 em comparação às placentas com genótipo hSTAT2KI, o que possivelmente contribui para o melhor controle da viremia observado anteriormente. Embora outros ISGs também tenham sido testados (MX1 e ISG15), os níveis de expressão foram muito indetectáveis nesse período pós-infecção escolhido. Além dos ISGs, investigamos a expressão de citocinas clássicas da resposta imune, incluindo IL-6, IL-1 β e TNF- α (Figuras 18B-D). Interessantemente, apesar de as placentas de genótipo hSTAT2KI provenientes da mãe hSTAT2KI ou da mãe WT apresentarem cargas virais equivalentes, o aumento na expressão IL-6 e IL-1 β foi mais acentuado quando a placenta se originou de um ambiente gestacional suscetível à infecção. Adicionalmente, observou-se um aumento discreto na expressão da citocina TNF- α em placentas de genótipo WT que se desenvolveram em mães hSTAT2KI, em comparação às placentas WT provenientes de mães também WT, mesmo diante de baixa viremia em ambos os grupos.

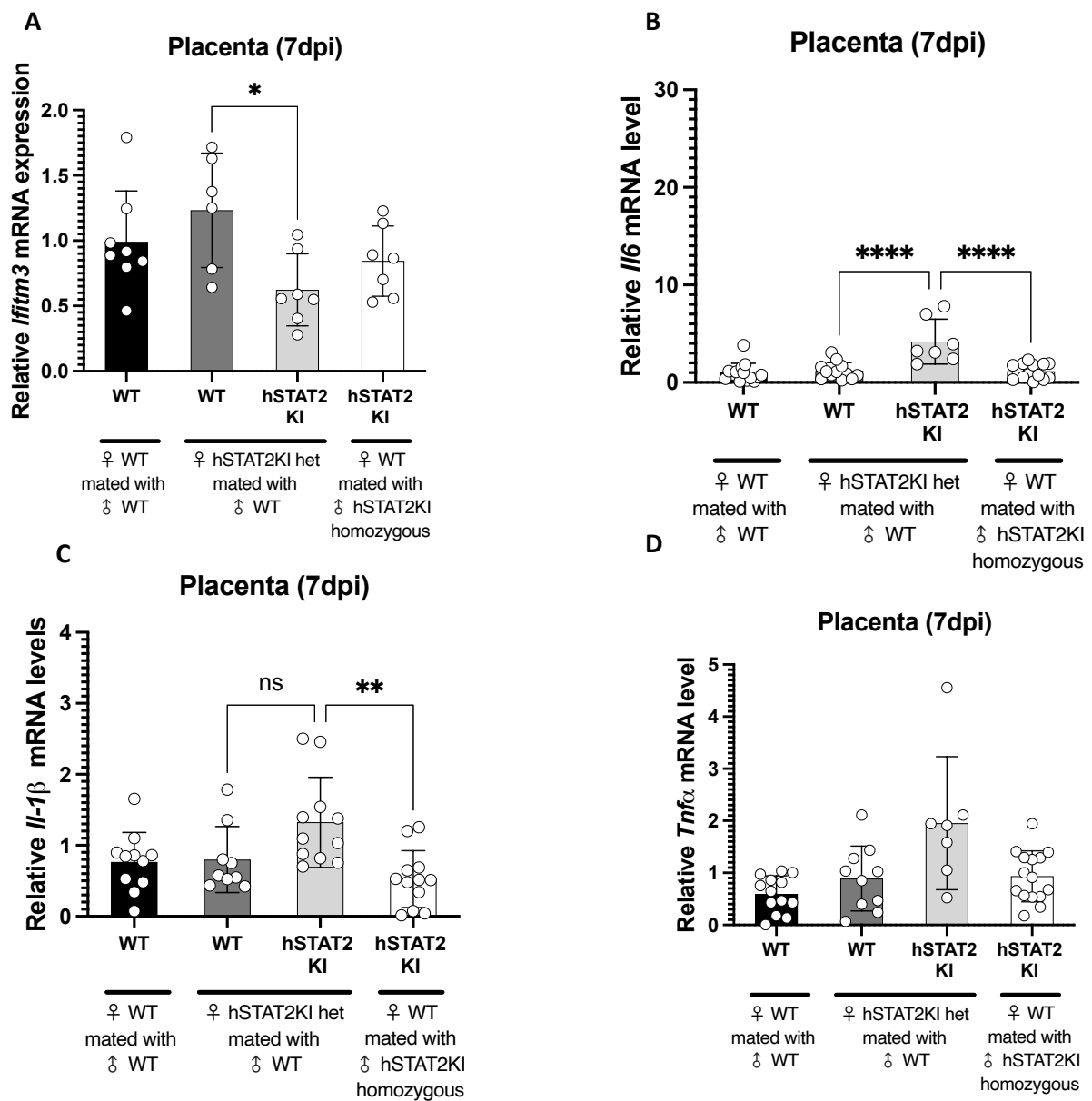


Figura 18: Placentas hSTAT2KI provenientes de mães KI apresentaram níveis mais elevados de marcadores inflamatórios em comparação tanto às placentas WT quanto às KI provenientes de mães WT. As fêmeas grávidas foram infectadas no E10.5, e 7dpi, as placentas foram coletadas e os níveis de mRNA de IFITM3 (a) IL-6 (b), IL-1 β (c) e TNF- α (d) foram avaliados por RT-qPCR. A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com os fatores “genótipo fetal” e “genótipo materno”, seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Esse conjunto de dados sobre a expressão de citocinas na placenta após a infecção por ZIKV em diferentes ambientes gestacionais levantou a questão de quais células imunes poderiam contribuir para o aumento dos marcadores inflamatórios observados, direcionando

nossa análise para a imunofenotipagem do tecido placentário 7dpi. Seguindo o painel e o esquema de *gating* detalhado na Figura 10, observou-se um número reduzido de células imunes totais isoladas do tecido placentário, como esperado para um compartimento imunoprivilegiado. A partir do *gating* em células vivas CD45⁺, estimamos a porcentagem de diferentes subtipos de células imunes com base em seus marcadores de superfície. Dentre essas populações, identificou-se uma maior proporção de APCs, caracterizadas por CD11c⁺MHC-II⁺, em placentas que vieram de mães hSTAT2KI, independentemente de o genótipo placentário ser WT ou KI (Figura 19A). Além disso, as placentas WT provenientes de mães hSTAT2KI apresentaram uma maior porcentagem de neutrófilos (CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G^{high}, Figura 19B) e células NK (Figura 20A) em comparação às placentas WT de mães WT.

Embora o painel de células imunes inatas tenha mostrado um padrão geral de aumento no genótipo hSTAT2KI geradas em mães também KI, somente as células CD11c⁺MHC-II⁺ se mostraram aumentadas comparado ao mesmo genótipo proveniente de mães WT. Entretanto, foi notável o aumento de aproximadamente duas vezes na proporção de linfócitos T CD8⁺ nas placentas hSTAT2KI de mães também KI (Figura 20B). Esses linfócitos, que normalmente são pouco abundantes na placenta durante a homeostase, indicam um processo inflamatório mais pronunciado nesse grupo em comparação aos outros. Esse aumento foi evidente tanto em relação às placentas WT, quanto às placentas hSTAT2KI que vieram de mães WT. De forma geral, esse conjunto de dados indicam que a inflamação materna não influencia na capacidade do ZIKV de infectar a placenta, mas possui um impacto na extensão da resposta imune gerada por este vírus no compartimento placentário. Para entender a extensão desse processo inflamatório, outros fluidos e tecidos do lado fetal serão avaliados posteriormente, a fim de entender o quão impactante pode ser essas diferenças no perfil inflamatório entre as proles e quais os seus desdobramentos.

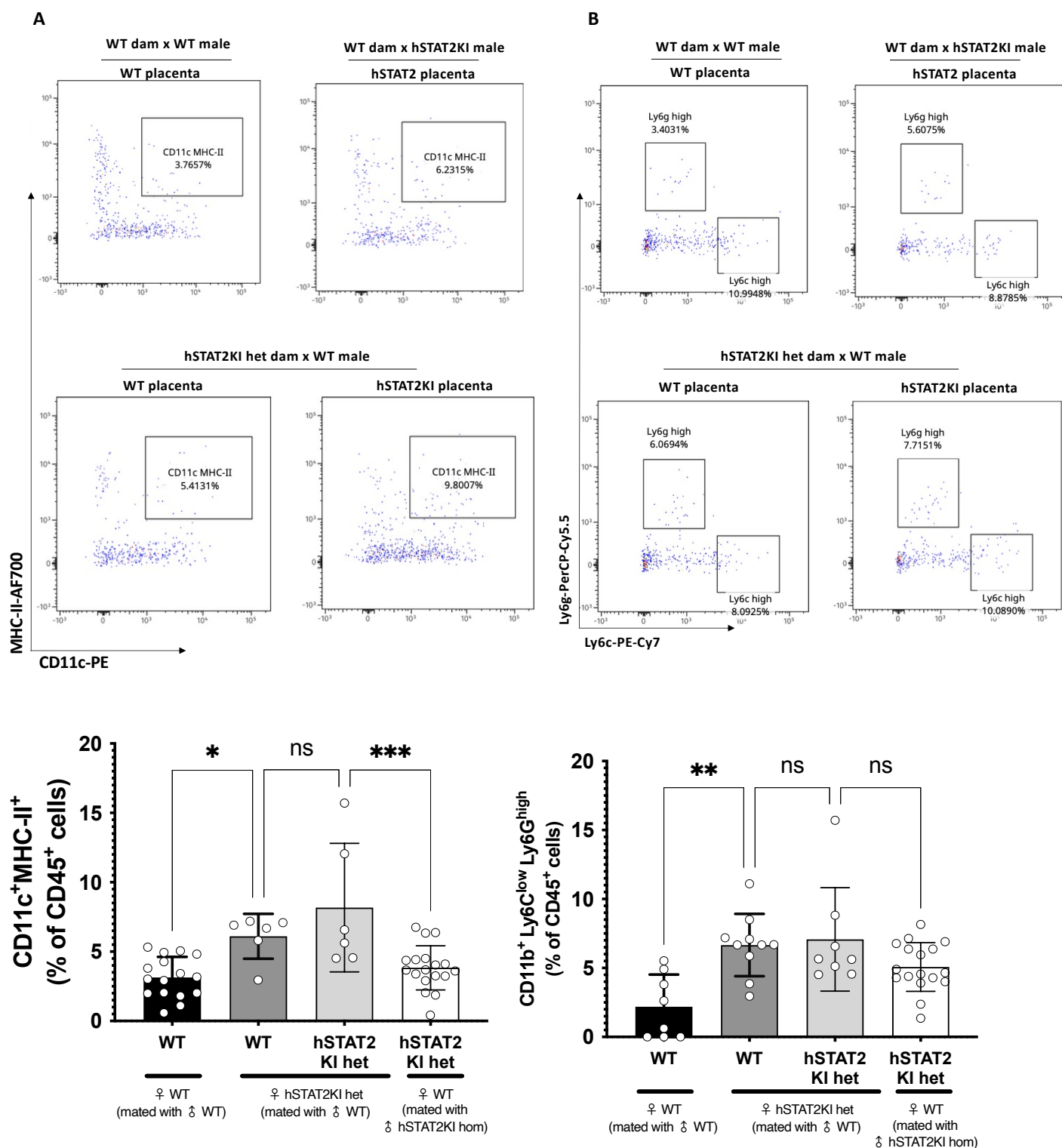


Figura 19: Imunofenotipagem placenta 7 dias após a infecção com ZIKV (APCs e neutrófilos). As células imunes foram isoladas das placentas utilizando gradiente de Percoll, e a imunofenotipagem foi realizada por FACS Symphony A1 (a-b). As células vivas foram distinguidas usando LIVE/DEAD™ Aqua, seguido do *gating* para células CD45 positivas. A porcentagem de CD11c⁺MHC-II⁺, Ly6c^{low}Ly6G^{high} foi avaliada após o *gating* em células CD3 negativas. A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com os fatores “genótipo fetal” e “genótipo materno”, seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

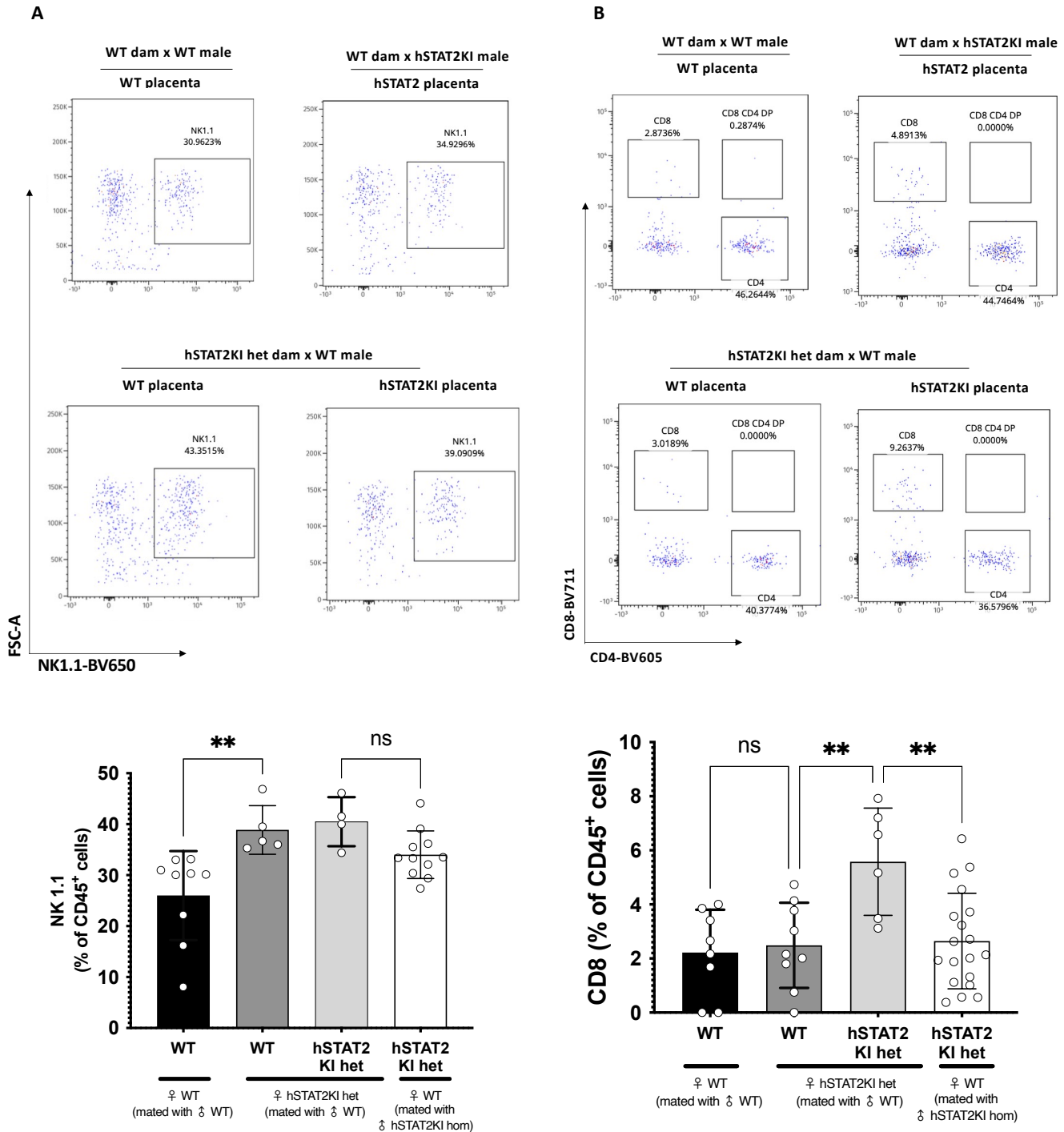


Figura 20: Imunofenotipagem da placenta 7 dias após a infecção com ZIKV (Células NK e Linfócitos). As células imunes foram isoladas das placentas utilizando gradiente de Percoll, e a imunofenotipagem foi realizada por FACS Symphony A1 (a-b). As células vivas foram distinguidas usando LIVE/DEAD™ Aqua, seguido do *gating* para células CD45 positivas. A porcentagem de NK1.1 foi avaliada após o *gating* em células CD3 negativas. A porcentagem de células CD8+ foi avaliada pelo *gating* em células CD3 positivas e CD4 negativas. A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com os fatores “genótipo fetal” e “genótipo materno”, seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.3. Aumento de marcadores inflamatórios na placenta de fetos fêmeas expostos ao ZIKV durante a gestação

Para melhor entender os efeitos da infecção do ZIKV durante a gravidez e seus desdobramentos na prole, investigamos se haveria uma maior suscetibilidade baseada em sexo, uma vez que existam indícios na literatura que as meninas possam ter maior prevalência de SZC (Paixão et al., 2022). Neste contexto, os dados foram analisados separadamente por genótipo e sexo para investigar possíveis diferenças de suscetibilidade. Conforme demonstrado na Figura 16, o genótipo WT apresentou carga viral baixa ou indetectável, acompanhada por níveis muito baixos de expressão de citocinas, o que refletiu em uma ausência de padrões para que a análise associada ao sexo pudesse ser feita. Diante disso, as análises foram focadas nas placentas de genótipo hSTAT2KI, considerando tanto as proles originadas de mães KI quanto aquelas de mães WT. Avaliando os resultados de carga viral 7dpi, é possível notar que, de fato, as placentas da prole fêmea possuem maior carga viral comparado às placentas de prole macho, para ambos os ambientes gestacionais (Figura 21A). Além disso, a expressão da citocina IL-6 também se mostrou aumentada em aproximadamente 3 vezes na placenta da prole fêmea, com um aumento ainda mais pronunciado quando são advindas do ambiente materno mais suscetível (Figura 21B), enquanto IL-1 β (Figura 21C) e TNF- α (Figura 21D) não demonstraram diferenças significativas entre os grupos.

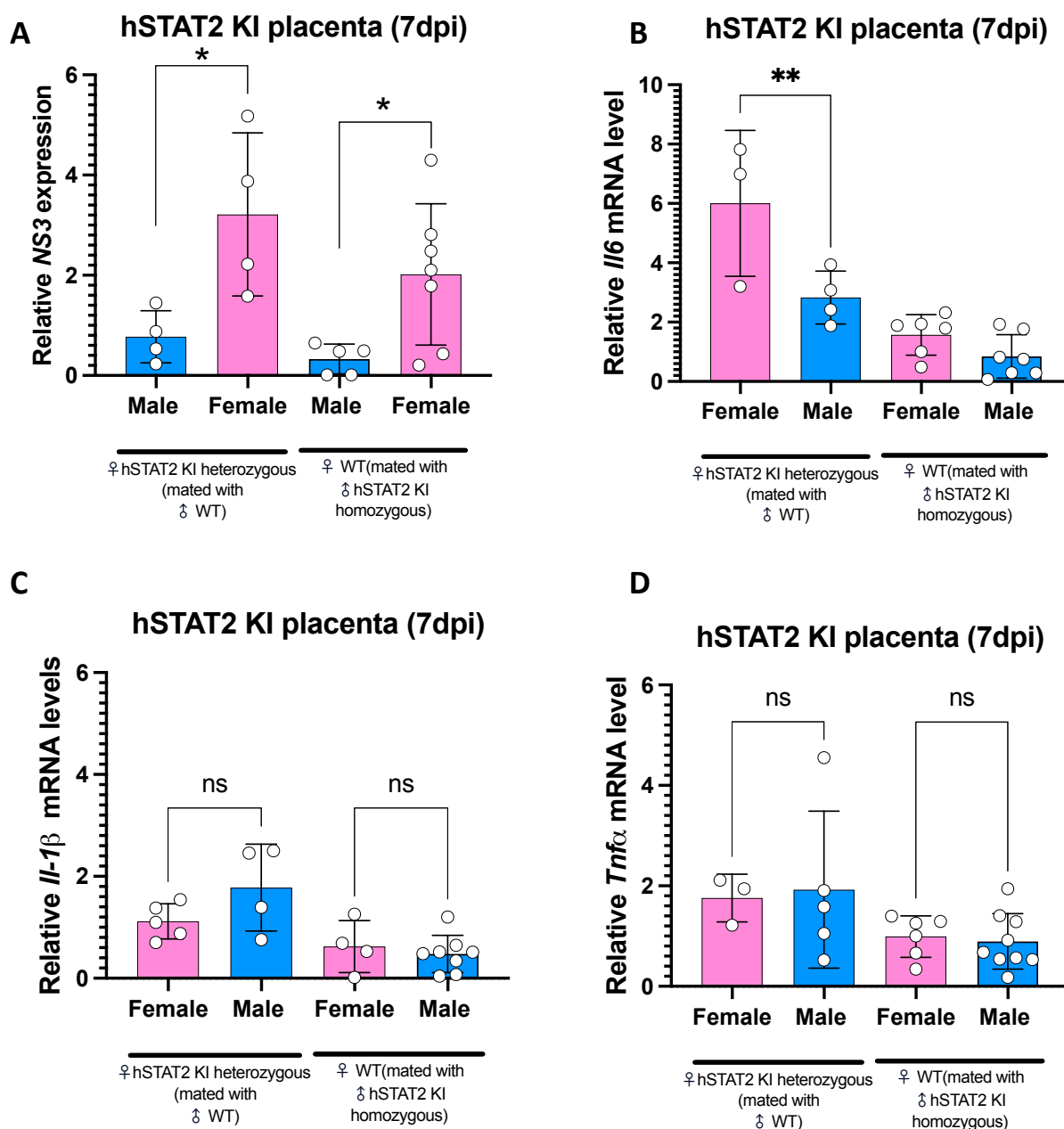


Figura 21: Placentas hSTAT2KI de fêmeas apresentam maior carga viral e níveis mais elevados de marcadores inflamatórios em comparação às placentas de machos. As fêmeas grávidas foram infectadas no E10.5, e 7dpi, as placentas foram coletadas para análise de RNA viral (a), e níveis de mRNA de IL-6 (b), IL-1β (c) e TNF-α (d). A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com os fatores “gênero” e “genótipo materno”, seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Para as imunofenotipagens realizadas no contexto do projeto, agrupamos os dados coletados em diferentes experimentos, os quais foram analisados conjuntamente. Esse procedimento foi adotado para garantir um número mínimo de amostras de machos e fêmeas

do genótipo hSTAT2KI, e permitir a comparação entre os grupos. Observou-se que, os grupos não apresentaram diferenças na porcentagem de células APCs (Figura 22A) e neutrófilos (Figura 22B), comparando placentas de fêmeas e placentas de machos. Por outro lado, no contexto da prole hSTAT2KI originadas em mães também KI, a porcentagem de células NK foi significativamente maior nas placentas de fêmeas em comparação às de machos, enquanto no mesmo genótipo oriundo de mães WT essa diferença não foi observada (Figura 22C). Curiosamente, a porcentagem de linfócitos T CD8+, previamente identificada como aumentada especificamente em placentas hSTAT2KI de mães também KI, mostrou-se maior nas placentas de fêmeas em comparação às de machos, indicando que as fêmeas possivelmente contribuem mais para o aumento observado na análise geral por genótipo (Figura 22D). Esses resultados evidenciam uma dinâmica importante durante a infecção pelo ZIKV. Destaca-se o aumento de células NK e linfócitos T CD8+, que, embora desempenhem uma função antiviral relevante, podem contribuir significativamente para uma resposta imune exacerbada, especialmente quando presentes no compartimento placentário, onde a detecção de ambas as populações celulares é consideravelmente limitada em condições de homeostase. Embora a porcentagem dessas células seja superior nas placentas fêmeas em comparação com as de machos, observa-se que as fêmeas apresentam maior carga viral, sugerindo a uma menor eficiência dessas populações em montar uma resposta antiviral adequada no contexto do genótipo hSTAT2KI, mesmo estando presentes em maior porcentagem.

Buscando entender um pouco mais acerca de importantes marcadores inflamatórios, é essencial considerar a resposta antiviral, especialmente porque a carga viral é detectada de forma diferencial entre os sexos. No entanto, o modelo animal utilizado neste projeto impacta diretamente na via de sinalização do IFN, o que torna desafiador avaliar os ISGs, devido à expressão limitada desses genes nos camundongos hSTAT2KI durante a infecção pelo ZIKV. Como esperado, a expressão do ISG *IFITM3* é pouco detectada nos camundongos hSTAT2KI infectados, dificultando a análise das possíveis diferenças de ISGs entre os sexos (Figura 22F). Em contrapartida, a expressão do receptor de IFN do tipo III, o IFN λ R, foi avaliada e, curiosamente, apresentou aumento nas placentas de machos em comparação às de fêmeas, o que pode contribuir para o controle mais eficaz da replicação viral (Figura 22E). Uma tentativa de detectar ISGs induzidos pela via de IFN λ foi realizada, mas, 7dpi, não foi possível observar níveis significativos de expressão desses genes, mesmo no genótipo WT. Isso sugere que uma resposta inicial dessa via poderia fornecer uma melhor compreensão dos achados apresentados nesta seção, em vez de uma detecção em tempo mais tardio. Contudo, até o momento, dados acerca de

ISGs expressos 1dpi ainda não foram coletados para confirmar esses resultados. No entanto, hipotetizamos que essa via seja fundamental para compreender as diferenças na capacidade de controle da replicação viral entre machos e fêmeas. Uma análise mais aprofundada desse tema será abordada na seção de Discussão da tese.

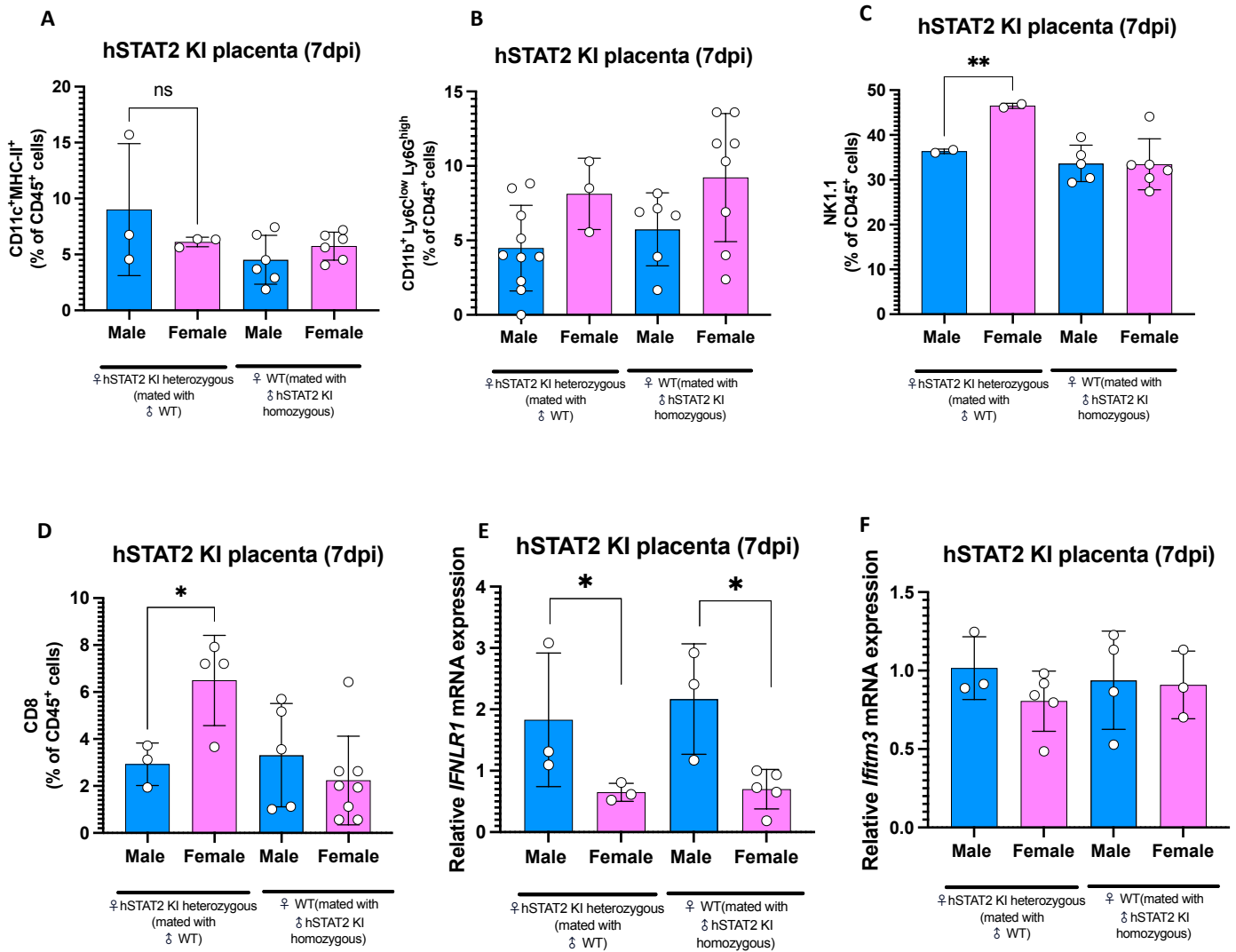


Figura 22: Marcadores diferenciais entre placenta de machos e de fêmeas após infecção com ZIKV durante a gestação. As fêmeas grávidas foram infectadas no E10.5, e 7dpi, as placentas foram coletadas. As células imunes foram isoladas das placentas utilizando gradiente de Percoll, e a imunofenotipagem foi realizada por FACS Symphony A1 (a-d). As células vivas foram distinguidas usando LIVE/DEAD™ Aqua, seguido do *gating* para células CD45 positivas. A porcentagem de CD11c⁺MHC-II⁺, Ly6C^{low}Ly6G^{high} e NK1.1 foi avaliada após o *gating* em células CD3 negativas (a-c). A porcentagem de células CD8⁺ foi avaliada pelo *gating* em células CD3 positivas e CD4 negativas (d). Os níveis de mRNA foram avaliados para o receptor 1 de IFN lambda (IFNLR1) (e) e para IFITM3 (f). A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com os fatores “gênero” e “genótipo materno”, seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.4.O efeito da exposição ao ZIKV no líquido amniótico durante a gestação

Para compreender o efeito do ZIKV na interface materno-fetal, caracterizamos as respostas imunes do lado materno, seguidas de uma análise detalhada de seu impacto na barreira placentária. Agora, avançamos para entender os processos que ocorrem além dessa barreira, iniciando com a análise do líquido amniótico. Os fetos foram coletados no dia E17.5, correspondente a 7dpi, e o líquido amniótico foi utilizado para análises de RT-qPCR com o objetivo de verificar se o ZIKV foi capaz de ultrapassar a barreira placentária no modelo estabelecido neste projeto.

Observou-se que o vírus foi detectado de forma equivalente no fluido amniótico da prole de genótipo hSTAT2KI, independentemente de a mãe ser também hSTAT2KI ou WT (Figura 23A). Esses dados confirmam que a capacidade do vírus de infectar o compartimento fetal está mais associada ao genótipo hSTAT2 da prole do que à suscetibilidade materna. Ao aprofundar a análise no genótipo hSTAT2KI para avaliar as diferenças entre os sexos, observamos um padrão semelhante ao encontrado na placenta: a prole fêmea apresentou maior carga viral em comparação à prole macho (Figura 23B). Além disso, ao medir a citocina IL-1 β por ELISA, identificamos um padrão interessante: mesmo apresentando cargas virais equivalentes, a prole hSTAT2KI de mães também hSTAT2KI apresentou aumento na detecção de IL-1 β (Figura 23C). Isso sugere que, embora o vírus infecte de forma semelhante a prole hSTAT2KI, o processo inflamatório pode ser amplificado pela exposição à maior inflamação materna, com as fêmeas apresentando o aumento mais pronunciado desse marcador inflamatório (Figura 23D). Em contrapartida, a prole WT que coexiste com a prole hSTAT2KI nas mães hSTAT2KI não apresentou carga viral detectável, nem aumento de IL-1 β . Esses dados indicam que, embora a exposição à inflamação materna possa amplificar a resposta inflamatória na prole infectada, ela, isoladamente, não aumentou os níveis de IL-1 β na prole WT.

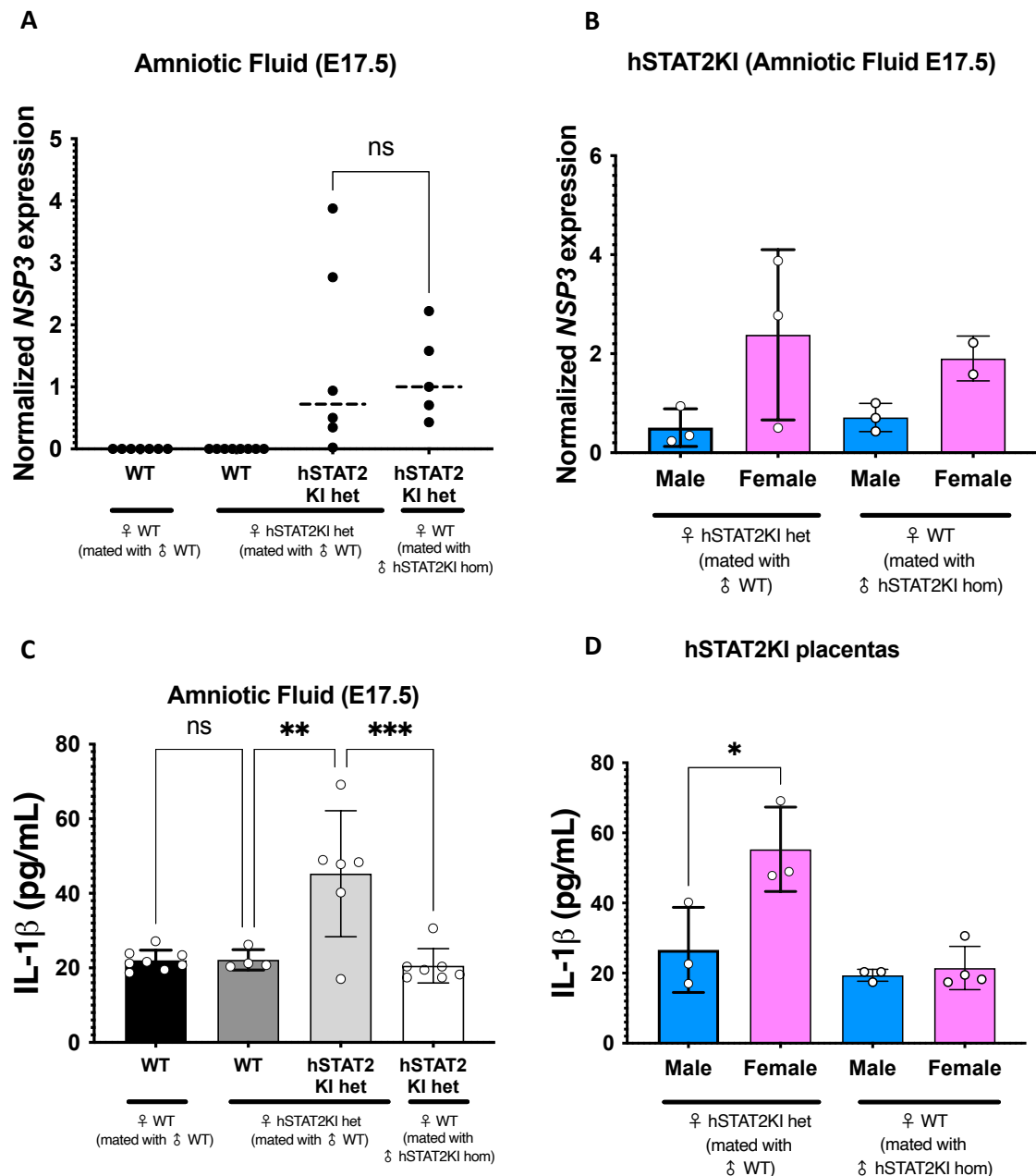


Figura 23: Detecção de RNA viral e citocinas no líquido amniótico. Fêmeas grávidas foram infectadas no dia E10.5, e o líquido amniótico foi coletado no dia E17.5. O RNA viral foi detectado por qPCR (a e b), e a citocina IL-1β foi detectada por ELISA (c e d). A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com os fatores “genótipo fetal” ou “gênero”, e “genótipo materno”, seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.5.Efeitos da exposição pré-natal ao ZIKV no cérebro fetal, no pós-nascimento e nas células imunes do baço da prole

Após avaliar os efeitos no lado materno, na barreira placentária e no líquido amniótico, passamos a investigar como o cérebro fetal responde ao modelo de exposição ao ZIKV. Fêmeas grávidas foram infectadas no dia E10.5, e os fetos avaliados 7dpi, correspondendo ao dia E17.5.

A análise da carga viral demonstrou que o vírus não foi detectado no cérebro fetal no período avaliado, em nenhum dos grupos (Figura 24A). É importante destacar que, nos estudos que investigam os efeitos do ZIKV, especialmente em relação à microcefalia, o tempo de infecção costuma ser mais precoce, como E6.5, conforme relatado na maioria dos artigos publicados (Phimister et al., 2016; Zorrilla et al., 2017). Além desse fator que poderia justificar a ausência de carga viral no cérebro, destaca-se também o baixo n amostral para essa coleta, o que, aliado à alta variabilidade dos dados, deve ser considerado como uma possível limitação do resultado. Embora a análise do cérebro fetal tenha sido limitada pelo número amostral, é interessante notar um padrão distinto na expressão de citocinas nesse tecido, em comparação ao observado na placenta, descrito na Figura 18. Enquanto na barreira placentária os fetos com genótipo hSTAT2KI, provenientes de mães também KI, apresentaram maior expressão de marcadores inflamatórios, no cérebro fetal ambos os grupos hSTAT2KI, tanto de mães WT quanto KI, exibiram um aumento nos níveis de IL-6 (Figura 24B). Em relação ao TNF- α (Figura 24C), os níveis parecem similares entre os grupos avaliados, enquanto a IL-1 β não apresentou níveis detectáveis no cérebro. Acrescentamos aqui um dado que chamou a atenção pelo sugestivo padrão de redução na expressão de *Rgs4* na prole oriunda de mães hSTAT2KI (Figura 24D), considerando que a sua redução pode favorecer a ocorrência de estresse celular integrado (Mitsi et al., 2024).

O cérebro também foi avaliado após o nascimento para investigar se alguma modulação persistiria nesse tecido na prole. De maneira geral, não foram detectadas alterações na massa cerebral, indicando a ausência de danos severos ao tecido (Figura 25A). Com um número amostral mais robusto, foi possível observar que a prole com genótipo hSTAT2KI, independentemente de serem oriundos de mães KI ou WT, apresentou um padrão semelhante de aumento na expressão de IL-6 (Figura 25B) e TNF- α (Figura 25C) que foi observado no cérebro fetal. Esse padrão difere do observado anteriormente na barreira placentária. Ainda mais interessante foi a análise com separação por sexo, que revelou que as fêmeas são as principais responsáveis pelos níveis mais elevados de expressão das citocinas IL-6 (Figura 25D) e TNF- α (Figura 25E). Esses achados reforçam a ideia de que as fêmeas apresentam maior impacto, desde a barreira placentária até a manutenção de uma resposta inflamatória mais persistente no cérebro após o nascimento.

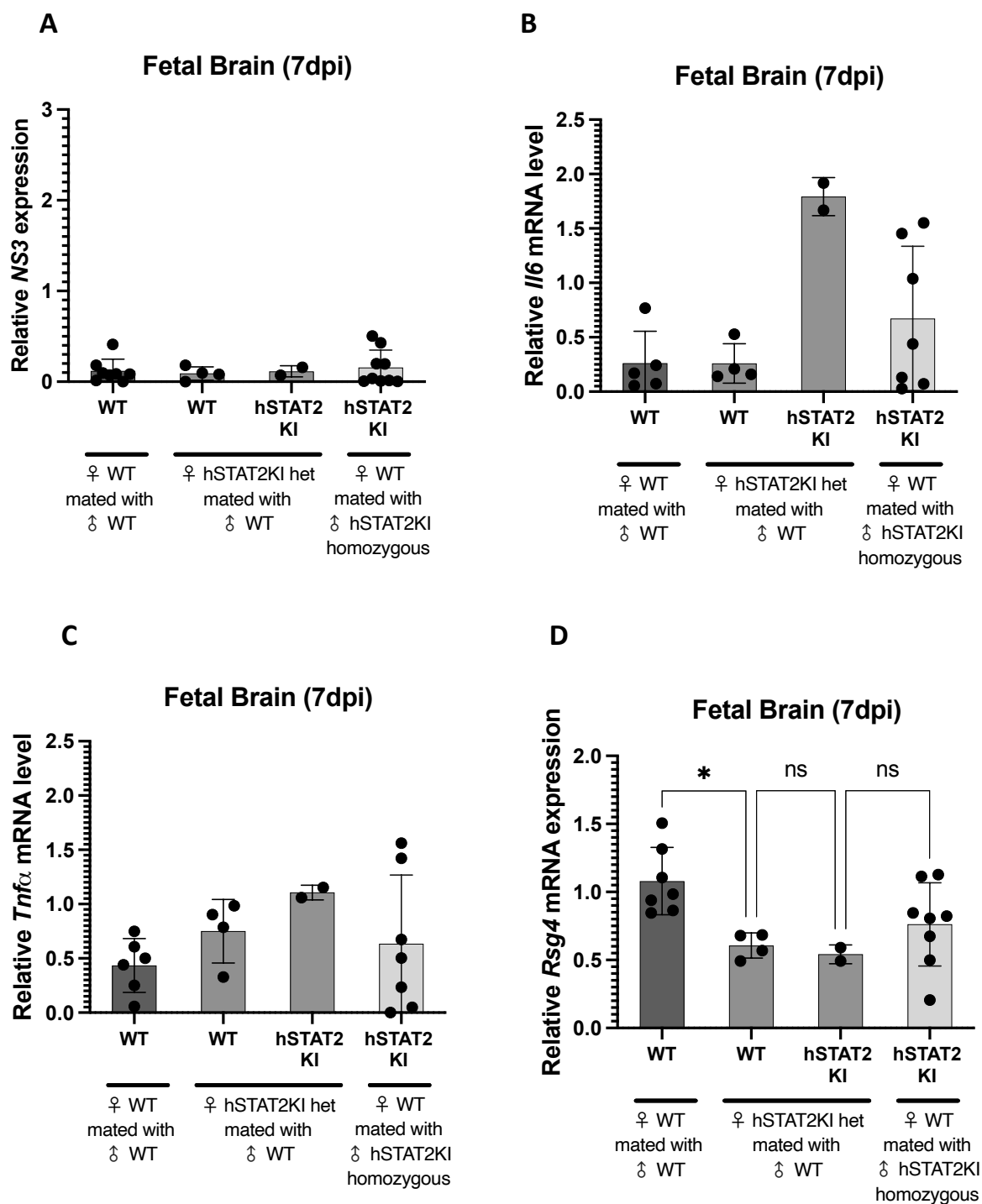


Figura 24: Análise de carga viral e citocinas no cérebro fetal após infecção durante a gestação. Fêmeas grávidas foram infectadas no dia E10.5 e o cérebro fetal avaliado para carga viral (a), e expressão de marcadores inflamatórios (b-d) por RT-qPCR. A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com os fatores “genótipo fetal” e “genótipo materno”, seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

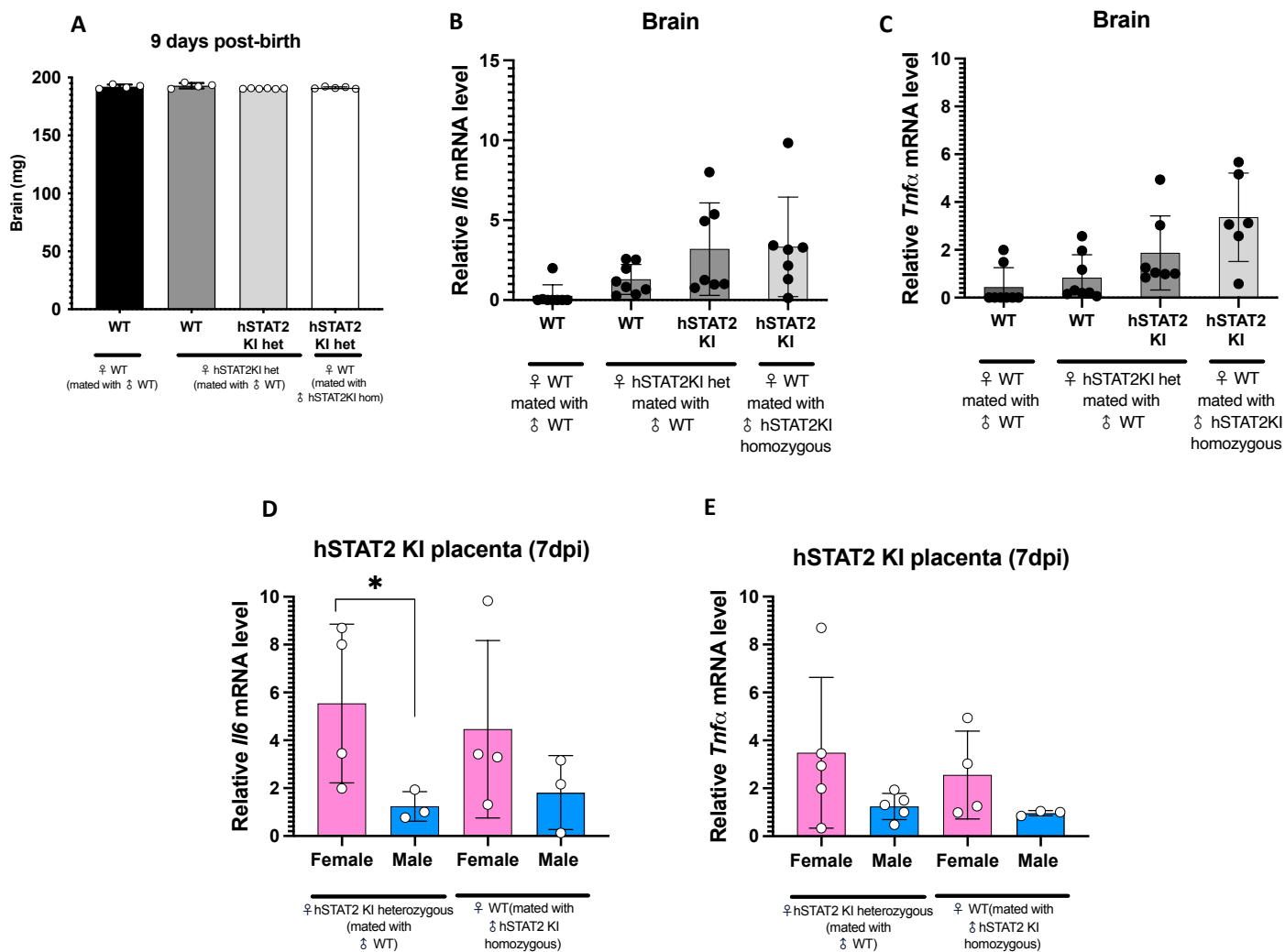


Figura 25: Fêmeas hSTAT2 mantêm a expressão de genes pró-inflamatórios no cérebro após o nascimento. Fêmeas grávidas foram infectadas no dia E10.5 e 9 dias após o nascimento, o cérebro foi avaliado quanto a massa (a), aos níveis de mRNA de IL-6 e TNF- α (b – c) por RT-qPCR, comparando os genótipos e os sexos (d – e). A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com os fatores “genótipo da prole” ou “gênero”, e “genótipo materno”, seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Para investigar se a prole exposta ao ZIKV durante a gestação poderia apresentar alterações no sistema imune após o nascimento, avaliou-se a massa do baço, que revelou uma esplenomegalia sutil no genótipo hSTAT2KI, independentemente do ambiente materno em que foi gerado (Figura 26A). A imunofenotipagem demonstrou que, embora não tenham sido observadas diferenças na porcentagem de células CD4⁺ efetoras (CD44⁺CD62L⁻) (Figura 26B), a prole hSTAT2KI oriunda de mães também KI apresentou uma maior porcentagem de linfócitos T CD8⁺ efetores em comparação aos grupos WT e ao genótipo hSTAT2KI de mães WT (Figura 26C). Esses achados fornecem evidências adicionais de que, apesar da carga viral

equivalente, os marcadores inflamatórios na placenta e o impacto no sistema imune são amplificados quando a prole, além de ser infectada pelo vírus na interface materno-fetal, também é exposta ao processo inflamatório materno. No entanto, observa-se que a inflamação materna, isoladamente, não é suficiente para causar alterações significativas na prole que é capaz de resolver a inflamação, como é o caso da prole WT geradas em mães hSTAT2KI. Isso destaca o papel conjunto da infecção vertical e da inflamação materna impactando os descendentes.

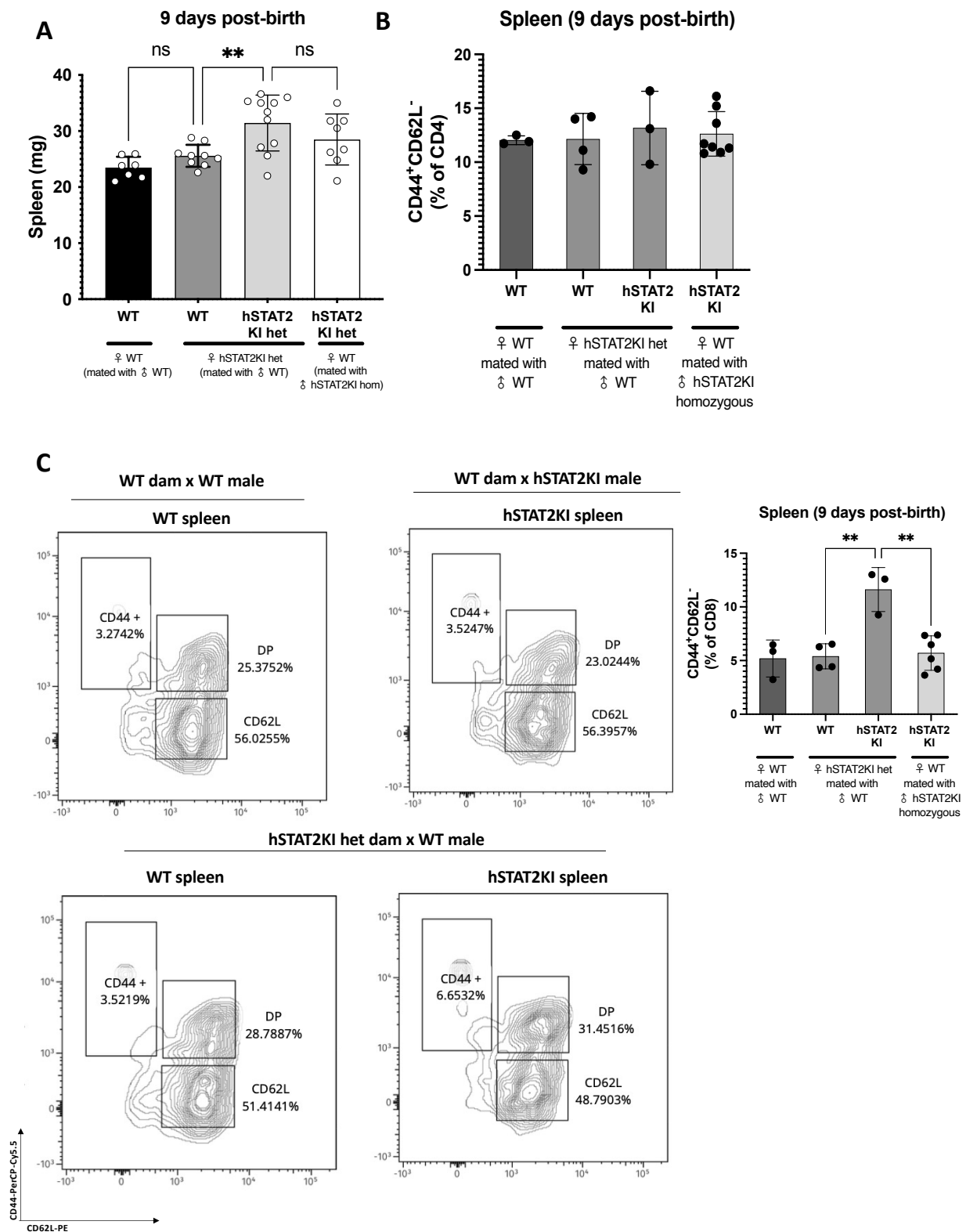


Figura 26. Alterações em linfócitos T CD8⁺ na prole hSTAT2KI originadas em mães também KI. Fêmeas grávidas foram infectadas no dia E10.5 e 9 dias após o nascimento, o baço foi coletado para análise da massa (a), bem como a porcentagem de linfócitos efetores CD44+CD62L- (b e c). A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com os fatores “genótipo da prole” e “genótipo materno”, seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.6. Alteração comportamental em prole fêmea após exposição ao ZIKV durante a gestação

Uma das abordagens mais importantes no contexto das infecções que afetam a interface materno-fetal é entender se a inflamação induzida durante a gestação pode impactar a prole ao longo da vida, com base em modelos experimentais que demonstram essa relação crucial com o desenvolvimento de desordens neurocomportamentais (Knuesel et al., 2014). Até o momento, os resultados discutidos na presente tese evidenciam que a infecção pelo ZIKV resulta no aumento de marcadores inflamatórios na placenta e no cérebro de camundongos hSTAT2KI que são oriundos de mães também KI, além da porcentagem elevada de linfócitos T CD8⁺ efetores mesmo após o nascimento, período em que a viremia já não é detectada. Em contrapartida, a prole hSTAT2KI de mães WT apresentou resultados carga viral positiva para o ZIKV na placenta e no líquido amniótico, mas foi exposta à menor inflamação materna, e consequentemente, apresentou menores níveis de marcadores inflamatórios na placenta. Nesse contexto, surgem questionamentos importantes acerca do impacto que a presença ou ausência da inflamação materna, bem como da persistência da infecção pelo ZIKV no compartimento fetal, poderia ter para o estabelecimento de uma patogênese mais pronunciada na prole.

Para esclarecer melhor essas questões, o ensaio de vocalizações ultrassônicas foi realizado no 9º dia pós-nascimento. Este método é amplamente utilizado na literatura para avaliar o comportamento de camundongos filhotes, especialmente a comunicação social entre o filhote e a mãe (Caruso et al., 2020). O aumento nas vocalizações está frequentemente associado a alterações comportamentais, como demonstrado em modelos de distúrbios neurocomportamentais induzidos pelo modelo de MIA (Shin Yim et al., 2017). Os dados coletados na presente tese mostraram um aumento nas vocalizações especificamente no genótipo hSTAT2KI, originado de mães também hSTAT2KI, enquanto a prole do mesmo genótipo, proveniente de mães WT, não apresentou essa alteração (Figura 27A). Em contrapartida, mesmo exposta à resposta imune materna, a prole WT oriunda de mães hSTAT2KI não demonstrou alterações comportamentais, com uma média de vocalizações semelhante à do grupo WT de mães WT. Esses resultados indicam que, de fato, a infecção vertical, associada à inflamação materna, exerce um impacto maior na prole. Ao analisar as vocalizações com base no sexo, observou-se que as fêmeas hSTAT2KI filhas de mães KI foram as principais responsáveis pelo aumento das vocalizações, enquanto os machos apresentaram médias semelhantes às das outras proles analisadas (Figura 27B e 27C). Esses dados também destacam como a prole fêmea pode estar em maior risco para a patogênese do ZIKV, desde as

análises no compartimento fetal até as alterações comportamentais observadas após o nascimento.

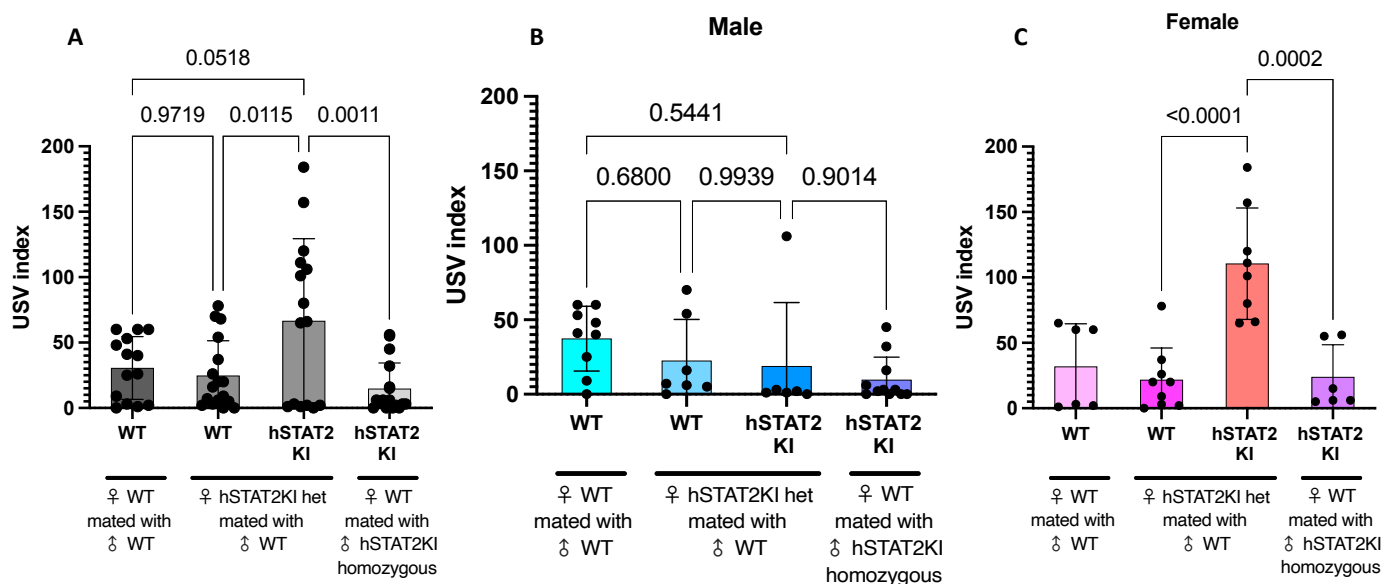


Figura 27: Fêmeas hSTAT2KI apresentam alteração comportamental após o nascimento. Fêmeas grávidas foram infectadas no dia E10.5, e 9 dias após o nascimento, foram realizadas vocalizações ultrassônicas (chamadas de USV). O índice plotado é resultante da contagem de vocalizações em um intervalo de 3 minutos e as comparações foram feitas por genótipo (a) ou gênero (b e c). A análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA com os fatores “genótipo da prole” “ou gênero da prole” e “genótipo materno”, seguida do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

5.7. Expressão diferencial do receptor de entrada viral na placenta

A partir das evidências de maior suscetibilidade da prole fêmea em relação aos machos, surge o questionamento sobre qual seria o mecanismo por trás desse fenômeno observado. Além do possível envolvimento da via de IFN-III explorado na Figura 19, os receptores de entrada viral emergem como um ponto crucial a ser investigado. Embora o papel desses receptores ainda seja debatido na literatura, o receptor AXL continua sendo considerado o principal candidato para a entrada do ZIKV nas células hospedeiras (F. Li et al., 2017; Meertens et al., 2017; Strange, Jiyarom, Pourhabibi Zarandi, et al., 2019; Strange, Jiyarom, Zarandi, et al., 2019). Para evitar as nuances que a exposição ao ZIKV provoca no modelo hSTAT2KI, avaliamos a expressão de AXL e outros receptores virais em camundongos WT em condições de homeostase, na ausência de infecção. Inicialmente, ao analisar a expressão de AXL, não identificamos diferenças significativas no baço (Figura 28A) nem no cérebro (Figura 28B) entre machos e fêmeas. No entanto, ao avaliar a expressão de AXL na placenta, observamos uma expressão aproximadamente duas vezes maior deste receptor nas placentas de fêmeas em

comparação às de machos (Figura 28C). Para verificar se esse efeito seria específico do AXL ou se outros receptores candidatos também apresentariam o mesmo padrão na placenta, avaliamos a expressão de TIM1 e do ligante Gas6. Contudo, não foram observadas diferenças significativas associadas ao sexo para esses fatores (Figura 29D e 29E). Esses dados sugerem que, além do potencial envolvimento da via de IFN-III no controle da replicação viral, a entrada do ZIKV poderia ser favorecida no ambiente placentário de fêmeas devido à maior expressão de AXL. Isso aponta para um possível mecanismo que contribui para a maior suscetibilidade da prole fêmea à infecção pelo ZIKV.

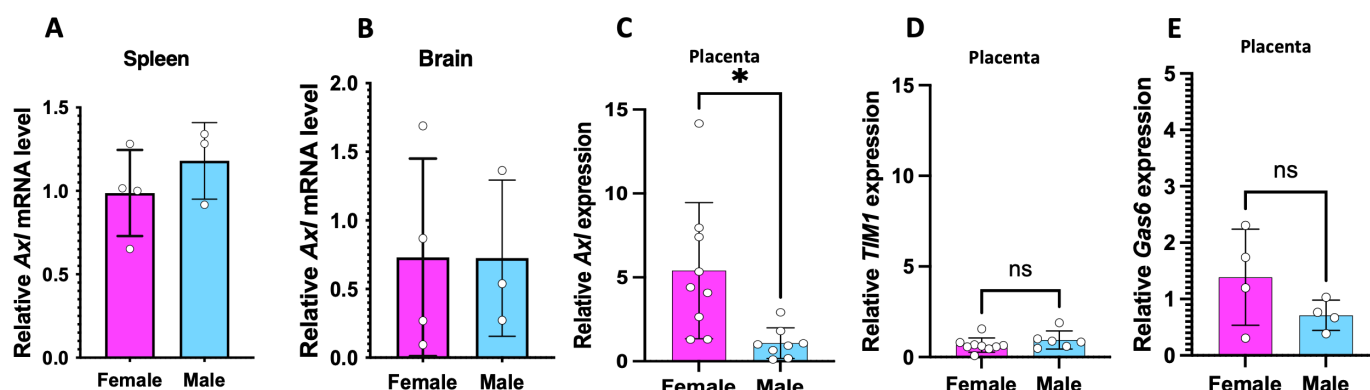


Figura 28: Expressão diferencial de Axl na placenta de fêmeas durante a homeostase. A expressão gênica de AXL por RT-qPCR foi avaliada no fígado (a), cérebro (b) e placenta no dia E17.5 (c), bem como de TIM1 (d) e Gas6 (e). A análise estatística foi realizada pelo teste Mann-Whitney, considerando a comparação entre os dois grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.8. Alterações a curto e longo prazo na prole fêmea hSTAT2KI após exposição ao ZIKV durante a gestação

A prole hSTAT2KI originada de mães também hSTAT2KI suscetíveis foi a mais impactada, desde alterações na interface materno-fetal até mudanças comportamentais. É essencial compreender se essas alterações persistem ao longo da vida, especialmente ao comparar fêmeas e machos do mesmo genótipo e ambiente materno. Para explorar esse aspecto, o baço de camundongos hSTAT2KI, expostos ao ZIKV no dia E10.5, foi coletado e analisado 4 semanas após o nascimento. Os resultados mostraram que as fêmeas mantêm uma maior porcentagem de linfócitos T $CD8^+$ e $CD4^+$ efetores, e de células $NK1.1^+$ mesmo após 4 semanas, sugerindo um impacto duradouro da exposição ao ZIKV e à inflamação materna (Figura 29A-29C). Em contrapartida, a porcentagem de células $CD4^+FoxP3^+$ não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 29D). Esses dados reforçam que a exposição ao

ZIKV no ambiente materno pode gerar efeitos a longo prazo na imunidade da prole, com maior impacto observado nas fêmeas.

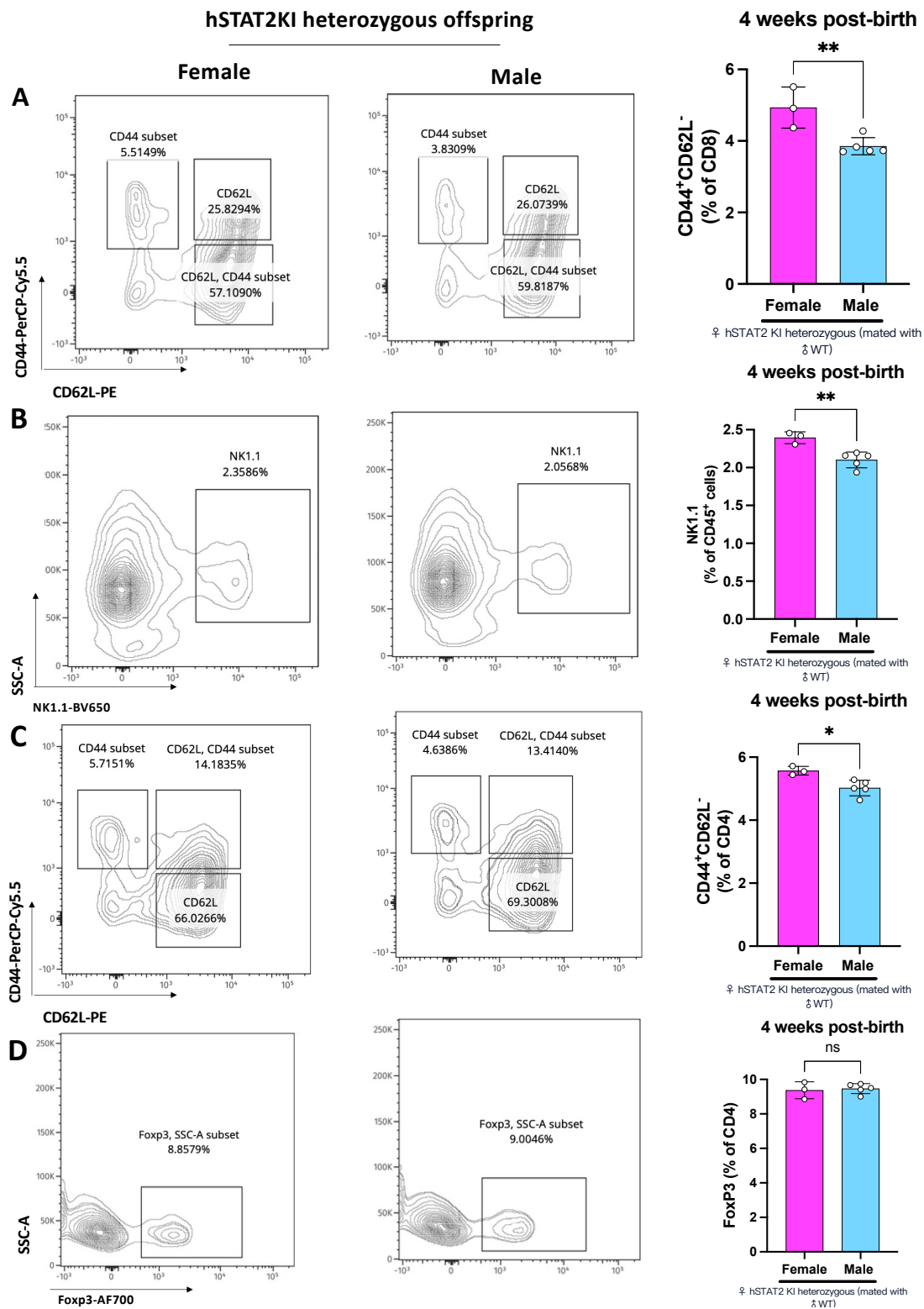


Figura 29: Alterações a longo prazo na prole fêmea hSTAT2KI após exposição ao ZIKV durante a gestação. Camundongos grávidas foram infectados no dia E10.5, e 4 semanas após o nascimento, o baço foi coletado e a imunofenotipagem foi avaliada por FACS Symphony A1 (a - d). As células vivas foram distinguidas usando LIVE/DEAD™ Aqua, seguido do *gating* para células CD45

positivas. A porcentagem de células CD8+ ou CD4 efectoras foi avaliada pelo *gating* em células CD3 positivas, CD44+CD62L- (A e C); a porcentagem de NK1.1+ foi avaliada após o *gating* em células CD3 negativas (b); a porcentagem de células Foxp3+ foi avaliada após o *gating* em células CD3+ CD4+ (d). A análise estatística foi realizada pelo teste Mann-Whitney, considerando a comparação entre os dois grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

6. Discussão

Neste capítulo, investigamos a interação entre a infecção vertical pelo ZIKV e a ativação do sistema imune materno, analisando seus efeitos de curto e longo prazo na prole fêmea exposta ao vírus durante a gestação. Essa abordagem foi motivada pela crescente discussão na literatura sobre como a exposição a patógenos durante o período gestacional pode influenciar o desenvolvimento fetal e contribuir para o surgimento de desordens neurocomportamentais nos descendentes, sendo a ativação do sistema imune materno uma possível ponte para tais patologias (Kalish et al., 2021; Knuesel et al., 2014; Tartaglione et al., 2022). O mais intrigante, e complexo, ao expandir essa análise para a infecção pelo ZIKV é considerar o envolvimento de duas interfaces distintas: sua capacidade de infectar diretamente o compartimento placentário e o possível papel da inflamação materna nos desfechos observados na prole, um aspecto ainda pouco elucidado na literatura. Para explorar essas nuances, delineamos um esquema experimental baseado em cruzamentos utilizando modelos suscetíveis e resistentes. Nesse modelo, geramos uma prole que expressa hSTAT2 em tecidos de origem fetal, incluindo a placenta, tornando-os potencialmente suscetíveis à infecção pelo ZIKV, mas que se desenvolveram em fêmeas WT, resistentes à infecção. Em paralelo, para fins de comparação, fêmeas heterozigotas hSTAT2KI, suscetíveis ao ZIKV, foram cruzadas com machos WT, resultando em proles que podem ser WT ou hSTAT2KI, coexistindo em um mesmo ambiente materno. Dessa forma, emergem duas questões centrais: 1) A prole hSTAT2KI oriunda de mães WT poderia apresentar impactos após o nascimento devido à exposição ao vírus, mesmo que o lado materno seja pouco suscetível? 2) A prole WT oriunda de mães hSTAT2KI, mesmo sendo potencialmente resistentes, poderia ainda assim ser afetada pela exposição à inflamação decorrente do ambiente materno altamente suscetível? Essas perguntas orientaram o desenvolvimento do capítulo 1 desta tese, buscando desvendar as contribuições específicas da infecção viral direta e da ativação do sistema imune materno nos desfechos observados na prole.

Em humanos, a infecção pelo ZIKV está associada a degradação da proteína STAT2, inibindo as respostas antivirais mediadas por IFN-I e IFN-III, o que favorece sua replicação eficiente (Grant et al., 2016; Kumar et al., 2016b). Em camundongos, esse mecanismo não ocorre porque proteínas de alguns vírus, como a NS5 do ZIKV, não interagem eficientemente com a STAT2 murina, limitando a replicação viral e tornando a viremia indetectável cerca de dois dias após a infecção (Grant et al., 2016; Park et al., 1999). Para contornar essa limitação

sem utilizar camundongos imunossuprimidos, foi desenvolvido o modelo hSTAT2KI, que expressa STAT2 humana, publicado em 2018. Esse modelo é capaz de sustentar a viremia por períodos prolongados e permite a infecção vertical, sendo ideal para investigar os impactos do ZIKV no sistema imune e no desenvolvimento fetal (Gorman et al., 2018). Alinhando esse modelo animal ao nosso delineamento experimental ilustrado na figura 9, seria crucial demonstrar que fêmeas WT e hSTAT2KI apresentam, de fato, perfis inflamatórios distintos quando infectadas pelo ZIKV, confirmando a resistência do modelo WT e a suscetibilidade do modelo KI. Dados de carga viral materna evidenciaram não apenas essa diferença, mas também um fenômeno interessante: fêmeas WT gestando placentas hSTAT2KI tornam-se ligeiramente mais suscetíveis devido à replicação viral no compartimento fetal, com viremia detectável no plasma em 7dpi, embora em níveis significativamente inferiores às fêmeas hSTAT2KI. Esse fenômeno indica uma comunicação bidirecional entre os compartimentos fetal e materno. Embora o fluxo viral geralmente ocorra do lado materno para o fetal, nossos dados indicam que adicionalmente poderia ocorrer um movimento contrário, onde o vírus replicado no compartimento fetal pode ser transferido de volta ao materno. Essa interação já foi explorada no contexto do ZIKV, onde proteínas como MAVS demonstraram restringir o vírus na zona juncional da placenta, influenciando a disseminação viral para ambos os compartimentos (Alippe et al., 2024). Estudos futuros seriam relevantes para explorar como a suscetibilidade fetal impacta a materna, revelando uma comunicação bidirecional na interface materno-fetal, em vez de uma interação unilateral tradicionalmente considerada.

Embora as gestantes de genótipo WT, que carregaram placentas de genótipo hSTAT2KI, tenham apresentado uma viremia residual em 7dpi, a carga viral e os marcadores inflamatórios foram significativamente maiores nas gestantes de genótipo hSTAT2KI, confirmando a adequação do modelo para a questão experimental. Entre os marcadores avaliados, destacou-se o aumento na produção de IL-6 no plasma das fêmeas hSTAT2KI. A produção materna de IL-6 durante a gestação é amplamente associada a modelos de MIA e suas consequências no neurodesenvolvimento (E. Kim, Huh, et al., 2024; Rudolph et al., 2018b; Sarieva et al., 2023). Em particular, a IL-6 está vinculada a alterações na expressão do fator Rgs4 nos descendentes, impactando o controle de respostas integradas ao estresse (Mitsi et al., 2024). Este efeito foi corroborado pelos dados obtidos do cérebro fetal, que mostraram uma redução na expressão de Rgs4 em camundongos oriundos de mães hSTAT2KI, as quais apresentaram os níveis elevados de IL-6. Além disso, foi descrito que a exposição pré-natal à IL-6 está associada a níveis elevados da citocina na prole após o nascimento, tanto no

hipocampo quanto na circulação (Samuelsson et al., 2006). Em conformidade com a literatura, as placentas de genótipo hSTAT2KI, independentemente da origem materna (WT ou KI), apresentaram maior expressão de IL-6. Consequentemente, os níveis elevados da citocina foram observados também nos cérebros fetais e na prole após o nascimento. No entanto, é crucial destacar que as placentas hSTAT2KI provenientes de mães KI foram duplamente impactadas: não apenas apresentaram níveis elevados de IL-6 no ambiente placentário, mas também sofreram a influência direta da produção aumentada de IL-6 parental. Este cenário sugere que a citocina materna pode exercer um impacto adicional sobre os descendentes, amplificando os efeitos adversos já induzidos pela expressão elevada de IL-6 no tecido de origem fetal (Dahlgren et al., 2006).

O compartimento placentário, além de ser essencial para o desenvolvimento fetal, desempenha um papel crucial na proteção contra patógenos na interface materno-fetal. Essa defesa envolve uma resposta imune inata ativada pelo reconhecimento de patógenos por receptores de reconhecimento padrão, que são expressos por células imunes residentes no tecido, como os macrófagos Hofbauer e os trofoblastos (Narang et al., 2021). A proteção contra agentes virais exige uma via antiviral eficaz, mediada pelo reconhecimento de TLRs ou RIG-I, que ativa o sinalizador MAVS e culmina na produção de interferons (IFNs) (Jabłońska et al., 2018; Y. Wang et al., 2023). A importância dessa via de sinalização no próprio compartimento placentário, sem a participação direta da resposta imune materna, foi evidenciada pelos dados de carga viral apresentados. Mesmo com uma mãe apresentando alta carga viral de ZIKV no plasma, as placentas WT são inicialmente infectadas, mas, aos 7dpi conseguem eliminar a viremia. Isso demonstra o papel crucial da via de sinalização de IFN funcional no controle da replicação viral dentro do compartimento fetal, evidenciado pela ausência de viremia tanto na placenta quanto no líquido amniótico 7dpi, e pelo aumento da expressão do ISG IFITM3 pelas placentas WT.

Avaliar as respostas imunes na barreira placentária é desafiador, especialmente no contexto de infecções que atingem o compartimento fetal (Hoo et al., 2020). Nesse cenário, as respostas geradas podem ser influenciadas por células imunes maternas, células imunes fetais ou pelos próprios trofoblastos. Durante infecções na placenta, células imunes maternas, como macrófagos e linfócitos T CD8⁺, frequentemente migram para o compartimento placentário (Enninga et al., 2020; Parker et al., 2020). Embora contribuam para o controle viral, essa migração pode desestabilizar o ambiente imunoprivilegiado da placenta, essencial para o

desenvolvimento fetal adequado. Por outro lado, no estágio de desenvolvimento embrionário E17.5, além dos macrófagos de origem fetal, células Hofbauer, células T derivadas do timo, células NK e células dendríticas fetais também são capazes de transitar entre os compartimentos fetais e exercer funções imunes na placenta, tanto durante a homeostase quanto em perturbações causadas pela presença de patógenos (PrabhuDas et al., 2015; Rackaityte & Halkias, 2020; Svensson-Arvelund et al., 2015). Curiosamente, observamos que, apesar de apresentarem a mesma carga viral, as placentas hSTAT2KI provenientes de mães também hSTAT2KI exibem maior expressão de citocinas inflamatórias e maior proporção de células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos T CD8⁺. Isso sugere que a resposta imune materna influencia diretamente o ambiente inflamatório placentário, uma vez que os genótipos são idênticos, a carga viral é equivalente, mas as respostas diferem em função do ambiente materno. No entanto, um achado interessante desafia essa interpretação: placentas WT que coexistem com placentas hSTAT2KI em mães KI também apresentam aumento de subpopulações de células imunes, como APCs, neutrófilos e células NK. Ainda assim, essas placentas WT exibem menores níveis de expressão de citocinas inflamatórias em comparação às placentas vizinhas hSTAT2KI. Esses resultados nos levam a hipotetizar que, caso as células detectadas na placenta sejam de origem materna, estas poderiam ser diferentemente moduladas no compartimento fetal, dependendo da capacidade de cada compartimento em controlar a infecção. Em outras palavras, a capacidade do compartimento fetal de controlar a infecção parece modular a intensidade da resposta imune materna que é transferida para a placenta, influenciando diretamente a resposta imune final resultante da interação entre as contribuições maternas e fetais. Por fim, é importante destacar que, apesar do aumento de células-chave com funções antivirais, como linfócitos T CD8⁺ e células NK, a viremia em animais hSTAT2KI provenientes de mães também KI permanece equivalente comparado ao mesmo genótipo proveniente de mães WT, e permanece maior do que placentas WT. Isso reforça a importância da via de sinalização de IFN para que essas células desempenhem efetivamente sua função de eliminação viral. Além disso, o aumento dessas populações, além de falhar em conter a viremia, pode intensificar o processo inflamatório local, potencialmente amplificando os danos aos descendentes (Björkström et al., 2022; J. Liu et al., 2021; PrabhuDas et al., 2015).

Na literatura sobre TEA, há uma discussão ampla sobre a susceptibilidade baseada em sexo, com uma incidência masculina significativamente maior observada tanto em humanos quanto em modelos animais (M. L. Arnold & Saijo, 2021; McCarthy & Wright, 2017). Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar essa diferença, com destaque para alterações

imunológicas que podem contribuir para a disparidade. No entanto, no contexto da patogênese do ZIKV, os dados humanos indicam que meninas apresentam maior prevalência de SZC, uma manifestação severa associada ao vírus (Paixão et al., 2022). Corroborando esses achados, os resultados deste estudo revelaram uma maior suscetibilidade da prole fêmea desde o compartimento placentário, onde apresentaram maior carga viral e níveis mais elevados de marcadores inflamatórios, até aspectos comportamentais. Especificamente, as fêmeas hSTAT2KI, oriundas de mães também KI, demonstraram alterações na comunicação social. Além disso, fêmeas expostas ao ZIKV durante a gestação exibiram uma porcentagem mais elevada de linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ efetores, e de células NK1.1⁺, mesmo quatro semanas após o nascimento, um efeito semelhante ao observado em proles masculinas no modelo de MIA, onde a exposição ao PolyI:C resultou em células CD4⁺ primadas a longo prazo (E. Kim, Paik, et al., 2022b). O fenótipo com priming imune, além de potencialmente influenciar no desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, possui também a capacidade de aumentar o risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias ao longo da vida, incluindo disfunções gastrointestinais reportadas previamente (Doshi-Velez et al., 2015). Isso reforça a hipótese de que o desbalanço imunológico nas fêmeas pode ter impactos duradouros ao longo da vida e torná-las mais suscetíveis às doenças inflamatórias frente a um novo desafio na vida adulta.

Para investigar os mecanismos subjacentes a maior suscetibilidade da prole fêmea, voltamos ao compartimento placentário, pois as diferenças sexuais são evidentes desde a interface materno-fetal. Observamos níveis mais elevados de expressão do receptor de IFN-III (IFN λ R1), crucial para a resposta antiviral placentária, em placentas de machos 7 dias após a exposição ao ZIKV no genótipo hSTAT2. Curiosamente, estudos em andamento sobre disparidade de gênero em TEA já destacaram dinâmicas relacionadas à sinalização de IFN-I nas placentas (E. Kim, Lai, et al., 2024). Placentas masculinas, em homeostase, apresentam menores assinaturas associadas à via de IFN-I em trofoblastos, mas esse efeito é revertido sob desafio com PolyI:C, resultando em um aumento de ISGs. No contexto de uma infecção viral real, como no presente estudo, respostas robustas de IFN podem ser críticas para o controle da replicação viral e para reduzir a disseminação do vírus ao compartimento fetal. Já nos modelos clássicos, com o uso de miméticos ao invés do patógeno em si, sendo assim, estéreis, o aumento da via de sinalização de IFN poderia ter efeitos colaterais potencialmente nocivos, agindo mais como um fator de risco do que protetor. Caracterizar detalhadamente essas vias de sinalização pode ser essencial para compreender tanto a suscetibilidade em modelos clássicos de MIA quanto no contexto de infecção pelo ZIKV, ajudando a elucidar as bases imunológicas das

diferenças sexuais na vulnerabilidade. Além do possível envolvimento de IFNs, os dados apresentados neste estudo também indicaram uma maior expressão do receptor de entrada viral AXL na prole fêmea em comparação com a prole macho. Esse achado está alinhado com evidências prévias que demonstram a regulação positiva da expressão de AXL pelo estrogênio, como observado em estudos com tecido mamário (Berclaz et al., 2001). Placentas de fêmeas apresentam níveis mais elevados de receptores de estrogênio (Bukovsky et al., 2003), o que pode contribuir para o aumento da expressão de AXL e, consequentemente, favorecer a entrada viral no compartimento placentário.

Além das alterações imunológicas observadas na prole exposta ao ZIKV, especialmente nas fêmeas, também foi registrada uma maior expressão de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial no cérebro após o nascimento. Uma tese de doutorado do nosso grupo de pesquisa reforçou essa observação, demonstrando, por meio de análise proteômica, que a exposição sistêmica ao ZIKV (via intravenosa) pode aumentar a abundância de Cox7a2, uma subunidade do Complexo IV da cadeia transportadora de elétrons e Slc1a3, um transportador essencial para a homeostase do glutamato (Corrêa, 2020). Adicionalmente, o cérebro de fêmeas hSTAT2KI também apresentou aumento na expressão de glutaminase 1 (GLS1), indicando mais uma importante modulação no metabolismo celular após a exposição ao ZIKV que possui o potencial de permanecer a longo prazo nos indivíduos expostos.

Conclusão e perspectivas – Capítulo 1

Em síntese, os resultados obtidos nessa tese indicam a viabilidade do modelo experimental desenvolvido para investigar as dinâmicas da infecção pelo ZIKV na interface materno-fetal e o papel da ativação do sistema imune materno na patogênese da doença. Observou-se que, isoladamente, a inflamação materna induzida pelo ZIKV não é suficiente para gerar desordens evidentes nos descendentes, mas exerce um papel crucial na amplificação da resposta imunológica e no estabelecimento de alterações nos descendentes infectados verticalmente. Esses achados ressaltam a importância da ação conjunta entre a infecção vertical e a inflamação materna na orquestração da patogênese do ZIKV na prole. Além disso, evidências sugerem uma maior suscetibilidade das fêmeas à exposição ao ZIKV durante a gestação, com uma carga viral mais elevada no compartimento fetal e aumento de marcadores inflamatórios na placenta, no cérebro fetal e após o nascimento. Alterações comportamentais no pós-natal e um aumento na porcentagem de linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ efetores no primeiro

mês de vida indicam que as modulações imunes durante a gestação podem ter impactos a longo prazo nas fêmeas. Em conclusão, esta tese reforça que a interação entre infecção vertical e inflamação materna é determinante para a gravidade da patogênese do ZIKV na prole, especialmente em fêmeas, destacando a necessidade de investigar os mecanismos sexuais e maternos que modulam esse processo.

Como perspectivas para este trabalho, alguns questionamentos podem ser aprofundados em trabalhos futuros, incluindo: A expressão diferencial dos receptores de entrada do vírus poderia ser um fator determinante para a disparidade de sexo observada nos resultados? Quais são os fatores maternos específicos que amplificam a patogênese do ZIKV? As alterações comportamentais observadas nas fêmeas serão mantidas na vida adulta?

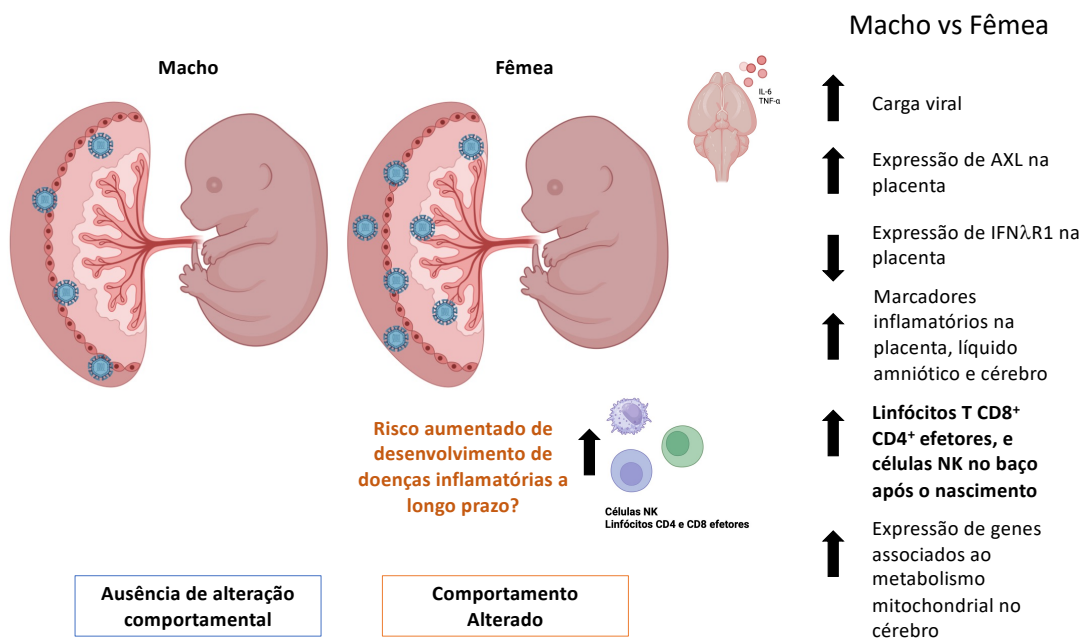


Figura 30: Modelo proposto reportando as diferenças sexuais nas respostas à infecção por ZIKV durante o desenvolvimento fetal. A imagem ilustra que fetos do sexo feminino, em comparação aos machos, apresentam maior carga viral e expressão aumentada do receptor AXL na placenta, acompanhadas por uma menor expressão de IFNλR1. Esses fatores estão associados a um aumento de marcadores inflamatórios na placenta, no líquido amniótico e no cérebro, além de maior ativação de linfócitos T CD8⁺, CD4⁺ efetores e células NK no baço após as primeiras semanas de vida. Essas alterações imunológicas podem estar relacionadas a alterações comportamentais e a um possível risco aumentado para o desenvolvimento de doenças inflamatórias a longo prazo. Em contraste, fetos machos não apresentaram alterações comportamentais detectáveis nesse contexto.

Capítulo 2: Avaliação das alterações metabólicas e dinâmica mitocondrial em micróglia infectadas pelo ZIKV: implicações para a neuroinflamação

1. Introdução

1.1 A micróglia como um alvo metabólico durante a neuroinflamação

O cérebro é um órgão altamente dinâmico, com atividade metabólica complexa, exigindo mudanças precisamente coordenadas para manter a homeostase celular (Bernier et al., 2020). Assim como outras células imunes, a micróglia, principal célula imune do parênquima do sistema nervoso central SNC, apresenta notável adaptabilidade metabólica. Essa plasticidade permite que a micróglia atue de forma eficiente na detecção de alterações no microambiente neural e na modulação de respostas inflamatórias, promovendo reparo tecidual ou, em situações de ativação persistente, contribuindo para o dano neuronal (Paolicelli et al., n.d.; Rock et al., 2004). Além da micróglia, outras células da glia, como os astrócitos, também exercem papéis centrais na regulação do metabolismo cerebral, no controle da barreira hematoencefálica e na resposta a infecções virais⁵. A interação entre micróglia e astrócitos forma um eixo essencial na coordenação das respostas imunes no SNC, e desequilíbrios nessas vias podem resultar em processos associados a diversas patologias, incluindo doenças neurodegenerativas e síndromes decorrentes de infecções congênitas (Orihuela et al., 2016; Socodato & Relvas, 2024).

Para além da imunovigilância, a micróglia participa de processos essenciais como angiogênese, remodelamento sináptico, regeneração axonal e reparo da mielina (Jung et al., 2025). Em condições homeostáticas, essas células monitoram constantemente o microambiente cerebral, contribuindo para sua preservação e equilíbrio funcional. Contudo, quando ativadas de forma disfuncional, passam a proliferar em excesso e liberar mediadores inflamatórios em níveis elevados, adquirindo um perfil neurotóxico frequentemente associado a diferentes condições patológicas (Orihuela et al., 2016). Durante episódios de neuroinflamação, os estados funcionais da micróglia se modificam dinamicamente, sendo marcados pela translocação de fatores de transcrição envolvidos na expressão de citocinas e quimiocinas, pelo acúmulo de corpúsculos lipídicos e pela reorganização do citoesqueleto. Essas alterações incluem mudanças morfológicas características, como o aumento do corpo celular e a retração

ou encurtamento dos prolongamentos, refletindo um fenótipo ativado, distinto da morfologia ramificada típica de micróglia em repouso (Figura 31) (Rosito et al., 2023).

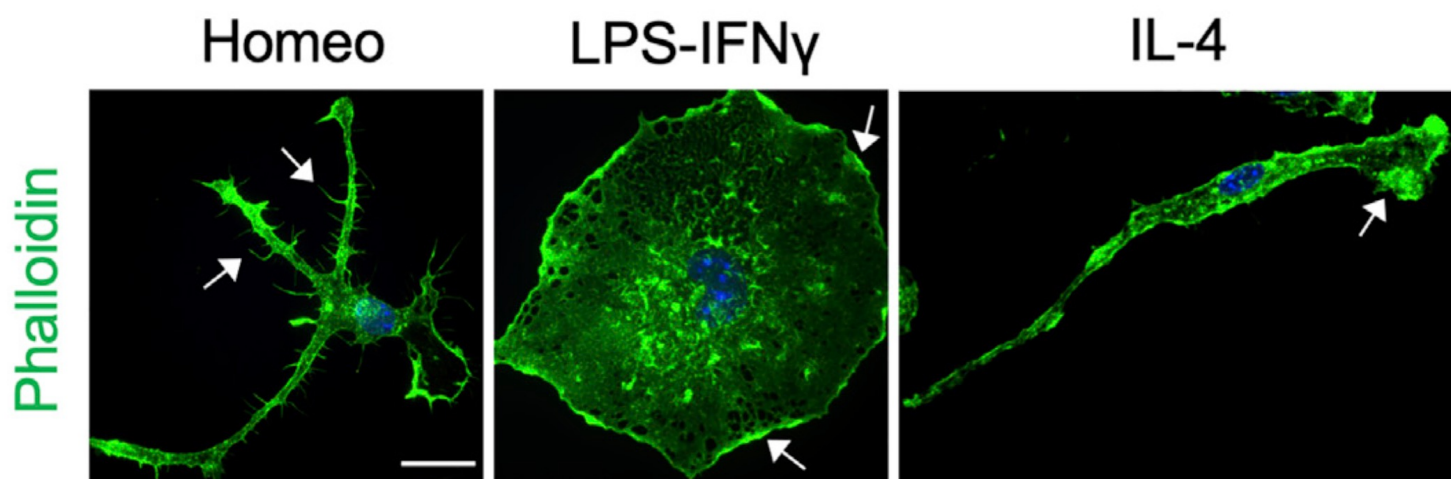


Figure 31: Imagens representativas em confocal de micróglia coradas com faloidina. Células ramificadas (homeostáticas) apresentam prolongamentos semelhantes a filopódios (setas), enquanto células amebóides (estimuladas com LPS-IFN γ para ativação) e bipolares (IL-4) exibem ondulações de membrana nas bordas e lamelipódios (setas). Núcleos visualizados com Hoechst. Adaptado de Rosito et al., 2023. Cell Reports

As adaptações permitem que a micróglia assuma diferentes estados funcionais. Para isso, essas células passam por mudanças metabólicas significativas, ajustando o metabolismo energético, lipídico e do ferro em resposta às demandas celulares (Bernier et al., 2020; Holland et al., 2018; Marschallinger et al., 2020). Essa flexibilidade metabólica, conhecida como imunometabolismo, possibilita à micróglia regular dinamicamente suas necessidades bioenergéticas para sustentar suas funções quando ocorrem mudanças no microambiente, como durante a inflamação. Estudos sugerem que, durante a homeostase, a micróglia prioriza a fosforilação oxidativa (OXPHOS) como principal fonte energética, que gera maior rendimento energético por molécula de substrato e permite a manutenção das atividades dinâmicas da micróglia, como a motilidade de vigilância (Bernier et al., 2020; Ghosh et al., 2018). Dentre adaptações metabólicas descritas na literatura, observou-se que micróglia de linhagem murina conseguem manter a OXPHOS ativa em condições de baixa disponibilidade de glicose por meio da utilização de outras fontes de carbono, como através da glutaminólise, consumo de piruvato, lactato e corpos cetônicos (Figura 32) (Bernier et al., 2020). Destaca-se, nesse contexto, a conversão de glutamina em glutamato, que por sua vez é convertido a α -

cetoglutarato, uma via particularmente relevante para a adaptação metabólica dessas células, pois representa uma alternativa altamente eficiente em termos energéticos, capaz de manter o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e sustentar a respiração mitocondrial em situações de baixa disponibilidade de glicose ou alta demanda bioenergética (Nagy et al., 2018).

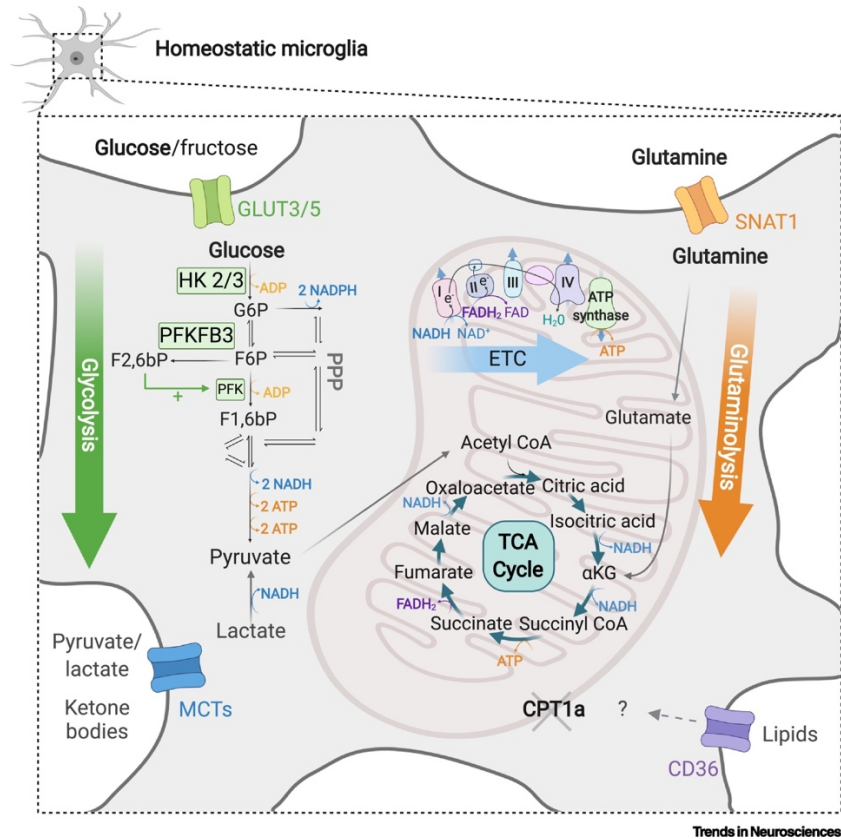


Figura 32: Adaptações do metabolismo microglial. Micróglias em condições homeostáticas preferencialmente utilizam glicose como principal fonte de energia. No entanto, essas células apresentam flexibilidade metabólica e podem recorrer à glutaminólise para suprir suas demandas energéticas. Dados transcriptômicos e metabolômicos também indicam a capacidade de metabolizar outras fontes de carbono, como frutose, piruvato, lactato e corpos cetônicos. Adaptado de Bernier et al., 2020. Trends in Neuroscience

Contudo, em contextos inflamatórios, a capacidade de adaptação metabólica da microglia pode ser comprometida devido à ativação celular prolongada, resultando em disfunção funcional, processo intimamente associado ao agravamento do dano tecidual em fases posteriores (N. Kim et al., 2024). Um dos marcadores clássicos do metabolismo de células imunes ativadas é o aumento da captação e da abundância intracelular de glicose, acompanhado de um redirecionamento metabólico (*metabolic shift*) da OXPHOS para a glicólise aeróbica, mesmo na presença de oxigênio (Figura 33) (Jung et al., 2025). Embora essa transição aumente a disponibilidade de energia e metabólitos para sustentar a ativação imediata, sua manutenção

por longos períodos pode levar à sobrecarga mitocondrial, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), e eventual morte celular por disfunção mitocondrial (Orihuela et al., 2016). Diversos estudos utilizando micróglias imortalizadas ou culturas primárias demonstraram esse padrão metabólico: frente a estímulos inflamatórios, como LPS e IFN- γ , essas células induzem a respiração glicolítica, reduzindo o fluxo da OXPHOS e favorecendo a rápida produção de ATP e intermediários bioquímicos necessários à resposta imune (Y. Hu et al., 2020; Nagy et al., 2018; Nair et al., 2019). É importante destacar que esse *shift* metabólico não é exclusivo das células imunes, tendo papel fundamental também em células tumorais, onde mecanismos adicionais já foram bem caracterizados. Dentre eles, destaca-se o papel glutaminólise, que contribui para a manutenção da atividade do TCA, mesmo quando a glicólise aeróbica está ativa (Filipp et al., 2012; C. Li et al., 2016). Dessa forma, as células tumorais conseguem sustentar simultaneamente a glicólise aeróbica e a OXPHOS, garantindo suprimento energético e metabólitos biossintéticos necessários para sua proliferação. Apesar de ser um mecanismo amplamente descrito em diversas linhagens tumorais, a dinâmica da glutaminólise durante o *shift* metabólico de micróglias ativadas ainda é pouco explorada, e seus impactos funcionais permanecem pouco compreendidos.

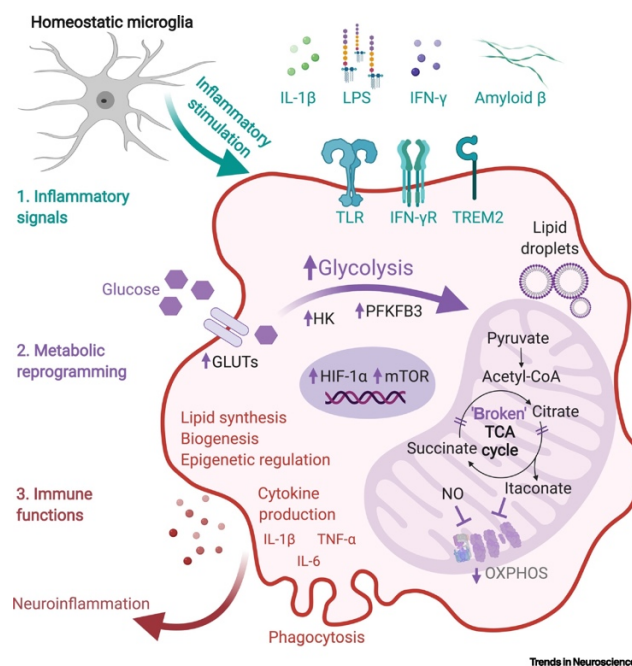


Figura 33: Adaptação metabólica da micróglia em estado de ativação. Estímulos inflamatórios induzem alterações nas vias metabólicas das micróglias, com aumento da glicólise, acúmulo de metabólitos do ciclo do TCA, redução da respiração mitocondrial e ativação dos fatores HIF-1 α e mTOR. Essas mudanças regulam funções imunes como a produção de citocinas e a fagocitose, contribuindo para a neuroinflamação. Adaptado de Bernier et al., 2020. Trends in Neuroscience

Como primeira linha de defesa contra patógenos invasores no cérebro, o entendimento reprogramação metabólica microglial ao longo de uma infecção pode ser essencial para novas descobertas frente aos danos induzidos pela neuroinflamação. Isso é particularmente relevante, pois infecções podem alterar o metabolismo celular, potencialmente comprometendo a homeostase das células hospedeiras (Codo et al., 2020; Sánchez-García et al., 2021; Sumbria et al., 2021). Vírus, por exemplo, costumam alterar o metabolismo das células hospedeiras para obter moléculas necessárias para sua replicação, o que pode levar a desequilíbrios metabólicos com efeitos na resposta celular (J. Li et al., 2023; Palmer, 2022). Ao mesmo tempo, células imunes também passam por alterações metabólicas em resposta à própria infecção, acumulando metabólitos que podem fortalecer a resposta antiviral e interferir na replicação viral (Palmer, 2022). Essa interação mútua entre sistema imune e patogênese viral evidencia a complexidade das relações entre hospedeiro e vírus. Compreender as adaptações metabólicas que acontecem nesse processo é fundamental para identificar respostas celulares que influenciam a patogênese viral e podem representar alvos terapêuticos. No entanto, esse tema permanece pouco explorado, especialmente no contexto de vírus neurotrópicos e seu impacto na ativação microglial, que influencia diretamente a neuroinflamação.

O ZIKV, além de estar associado à ocorrência da SCZ, leva a quadros complicações neurológicas em adultos, como a meningoencefalite e a mielite aguda (Carteaux et al., 2016; Mécharles et al., 2016), manifestações as quais estão frequentemente associadas à ativação de células gliais, em especial da micróglia (Z. Chen et al., 2019; Lum et al., 2017). Além da indução de marcadores inflamatórios, o ZIKV é reconhecido como um patógeno capaz de reprogramar o metabolismo celular em diferentes células. O vírus foi associado à indução de disfunção mitocondrial em células *neuronal-like* em um trabalho publicado previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Braz-De-Melo et al., 2019), bem como astrócitos (Ledur et al., 2020) e células placentárias (Q. Chen et al., 2020b), um efeito que contribui para a morte celular induzida pelo vírus. Contudo, apesar de diversos relatos sobre esse fenômeno, ainda há uma lacuna na compreensão das alterações metabólicas que definem a infecção por ZIKV em micróglia. Esclarecer essas alterações metabólicas é essencial para entender como vírus neurotrópicos modulam os estados de ativação microglial e contribuem para mudanças fenotípicas nas principais células imunes do cérebro. Esse conhecimento pode ampliar as

possibilidades terapêuticas para atenuar a neuroinflamação induzida pela micróglia, o que possui implicações profundas na manutenção da homeostase do SNC.

2. Justificativa

O ZIKV é um patógeno neurotrópico que, além de causar a SCZ, tem sido associado a manifestações neurológicas em adultos, como meningoencefalite e mielite aguda. Essas condições estão frequentemente relacionadas à ativação de células gliais, em especial da micróglia, que possui função essencial para a vigilância, defesa e manutenção da homeostase do SNC. Embora diversos estudos já tenham evidenciado a capacidade do ZIKV de induzir inflamação e disfunção mitocondrial em diferentes tipos celulares, os efeitos da infecção sobre o metabolismo da micróglia ainda não foram plenamente elucidados. Nesse contexto, destaca-se o crescente reconhecimento de que o estado funcional da micróglia está intimamente ligado ao seu perfil metabólico. A ativação microglial envolve uma reprogramação metabólica que modula processos como a produção de citocinas, a fagocitose e a sobrevivência celular. Tal reprogramação já foi descrita em outras patologias do SNC, mas permanece pouco explorada durante a infecção pelo ZIKV. Entender como essas alterações ocorrem no contexto da infecção pelo ZIKV pode contribuir para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na resposta neuroimune e, futuramente, ajudar na identificação de alvos terapêuticos que minimizem os danos ao SNC após a exposição a esse vírus neurotrópico.

3. Objetivos

3.1) Caracterizar parâmetros gerais da micróglia após infecção com o ZIKV avaliando:

- a viabilidade celular em tempos iniciais e tardios;
- a proliferação celular;
- a translocação de NF-kb;
- o remodelamento de citoesqueleto.

3.2) Avaliar a capacidade de replicação do ZIKV na micróglia, avaliando:

- a carga viral;
- a caracterização ultraestrutural de partículas virais.

3.3) Analisar a dinâmica mitocondrial da linhagem microglial infectada com ZIKV *in vitro* avaliando:

- a distribuição de mitocôndrias viáveis;
- a caracterização ultraestrutural de mitocôndrias;
- a função mitocondrial;
- a produção de espécies reativas;
- o perfil metabólico.

4. Metodologia

4.1 Linhagem de célula microglial e infecção *in vitro*

A linhagem microglial humana C20 foi desenvolvida por David Alvarez-Carbonell, da Case Western Reserve University, a partir do isolamento de micróglia primária derivada de tecido cerebral adulto humano. O processo incluiu a imortalização utilizando o antígeno T do vírus símio 40 (SV40 T) e a introdução da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT). O clone representativo, designado como C20, foi amplamente caracterizado quanto à expressão gênica, aos marcadores de superfície e ao perfil de citocinas secretadas (Davis et al., 2018). Essa linhagem foi gentilmente fornecida pelo Professor Hugo Paes, sendo cultivada em DMEM/F12 (1:1) suplementado com 10% de SFB e 100 µM de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich).

4.2 Infecção da linhagem de micróglia humana com ZIKV

As células C20 foram incubadas com DMEM (2% de SFB), e posteriormente infectadas com ZIKV PE243 (MOI 1) (GenBank KX197192.1) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. A incubação foi realizada por intervalos de 24, 48, 72 ou 96 horas, a depender da análise. Células não-infectadas foram incluídas no experimento como controle negativo. Os experimentos aqui descritos foram realizados em triplicata, sendo repetido ao menos três vezes de forma independente.

4.3 Viabilidade celular pelo ensaio MTT e liberação de lactato desidrogenase

As células C20 foram colocadas em placas de 96 poços (n=3) e infectadas (ou não) com ZIKV. Após 48 e 96 horas de infecção, a viabilidade celular dependente da atividade mitocondrial foi avaliada por 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio brometo (MTT Sigma-Aldrich) em uma concentração de 10% (5 mg/mL em PBS). As placas foram incubadas por 1 hora e, em seguida, analisadas por espectrofotometria a 570 nm. A métrica empregada

para quantificar a resposta celular foi a porcentagem de sobrevivência, explicitamente medida como a razão entre a atividade mitocondrial (representada pelos valores de luminescência) nas células infectadas em relação ao grupo controle não infectado. A liberação de lactato desidrogenase (LDH) foi avaliada por meio da atividade enzimática presente nos sobrenadantes celulares, utilizando um ensaio comercial de citotoxicidade (CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay). Esse teste detecta o LDH liberado por células danificadas, que catalisa a conversão de lactato em piruvato, resultando em uma reação colorimétrica. A intensidade da cor gerada, medida a 490 nm, é proporcional à quantidade de LDH presente, sendo a leitura a 680 nm utilizada para correção de fundo. A citotoxicidade foi determinada pela comparação dos níveis de LDH nos grupos infectados em relação aos controles (liberação espontânea) e às células completamente lisadas com o tampão de lise fornecido pelo kit (liberação máxima).

4.4 Microscopia de fluorescência confocal

Marcação de mitocôndrias viáveis: As células C20 foram plaqueadas em lâminas de vidro em uma placa de 24 poços e, após 48 horas de infecção, as mitocôndrias das células vivas foram marcadas com MitoTracker Red CMXRos (ThermoFisher Scientific) por 45 minutos. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS e, em seguida, fixadas por 15 minutos com Formalina (3,7%). Após a fixação, as células foram novamente lavadas e marcadas com DAPI por 5 minutos, na proporção de 1:5000 de DAPI/PBS. Após as lavagens, as amostras foram analisadas no microscópio confocal Leica TCS SP5. A quantificação da fluorescência foi realizada utilizando o *software* ImageJ.

Marcação de β -tubulina e NF- κ b: As células C20 foram plaqueadas em lâminas de vidro em uma placa de 24 poços e, após 48 horas de infecção, as células foram fixadas com Formalina (3.7%), seguindo o procedimento anteriormente descrito. Em seguida, as células foram permeabilizadas por 5 minutos com Triton X-100 a 0,1% (v/v), diluído em PBS 1X, seguidas de duas lavagens com PBS. Após a permeabilização, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti- β -tubulina humana (Invitrogen) ou phospho-NF- κ b p65 (Invitrogen), na concentração de 1:1000, *overnight* a 4 °C. Após incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, marcadas com o anticorpo secundário anti-Mouse – Alexa Fluor 594 (ThermoFisher Scientific), e incubadas por 2 horas a 4°C. Após duas lavagens, as amostras foram analisadas no microscópio confocal Leica TCS SP5.

4.5 Respirometria de alta resolução

Para avaliar o consumo de oxigênio mitocondrial, as células C20 foram plaqueadas em uma placa de 24 poços e infectadas com ZIKV, utilizando células não-infectadas como controle. Após 48 horas de infecção, aproximadamente 10^6 células foram ressuspensas em DMEM/F12 sem SFB. A taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi medida utilizando um respirometro de alta resolução (OROBOROS Oxygraph-2k) a 37 °C, com agitação contínua a 750 rpm e um volume final de 2mL. Para a calibração do equipamento, foi utilizado DMEM/F12, o mesmo meio utilizado para cultivo celular, em cada dia de experimento. O OCR basal foi calculado após a estabilização do fluxo de oxigênio e a adição das células. Diferentes substratos foram adicionados à câmara contendo as células, e o consumo de oxigênio foi medido após a estabilização do sinal. Como substratos, foram utilizados Oligomicina a 1,25 μ M, da qual o OCR ligado ao ATP foi obtido na análise final; Carbonil cianeto-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) em pulsos de 100nM, para analisar a capacidade respiratória máxima; por fim, a respiração foi inibida com Antimicina-A a 2,5 μ M, para analisar o consumo de oxigênio residual (ROX). O OCR ligado ao ATP foi apresentado como a diferença entre o OCR antes (respiração basal) e após (vazamento de prótons) a adição de Oligomicina, normalizado pela respiração basal.

4.6 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo

As espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares foram medidas utilizando CellROX Green (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante. Após 24h, 48h e 96h de infecção, as células C20 foram incubadas com 5 μ M de CellROX por 30 minutos, protegidas da luz a 37 °C. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas a 4 °C. A intensidade da fluorescência foi medida na citometria de fluxo, utilizando o FACS Verse no canal FL2. A geração de ROS foi expressa como intensidade média de fluorescência.

4.7 Análise de Perfil metabólico por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Extração dos metabólitos: As células C20 foram plaqueadas em placas de 6 poços, com uma densidade de 5×10^6 células por poço. Para a extração dos metabólitos, as células foram coletadas após 48 horas de infecção, transferidas para tubos Eppendorf e adicionados 1000 μ l de metanol puro (Sigma-Aldrich) e 60 μ l de ribitol (0,1mg/mL). As amostras foram então incubadas a 4 °C *overnight*. Após a incubação, as amostras foram sonificadas à temperatura ambiente por 15 minutos, seguidas de centrifugação a 10000G por 15 minutos. A

fração aquosa superior contendo os metabólitos foi transferida para um novo tubo, separando-se do lisado celular, e encaminhada para a próxima etapa experimental. As alíquotas foram secas a vácuo e, em seguida, passaram pelo processo de derivatização, realizado com 40µL de cloridrato de metoxiamina (20mg/mL, Sigma-Aldrich) em piridina (Merck), incubado por 2 horas à temperatura ambiente com agitação constante. Após a incubação, MSTFA foi adicionado às amostras, que foram incubadas por 30 minutos a 37 °C.

Perfil metabólico por GC-MS: Após a derivatização completa, 100µL das amostras foram transferidos para inserções de vidro de microvolume para cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), utilizando o sistema Agilent 7890-5975, equipado com uma coluna HP5-MS de 30 m (Agilent). As amostras foram injetadas em pulsos (10:1) a 230 °C, com fluxo contínuo de 0,6ml/min, usando hélio como gás carreador. Os cromatogramas obtidos foram inicialmente analisados por varredura completa (70 m/z a 600 m/z) e, em seguida, foi desenvolvido um método SIM (monitoramento seletivo de íons) para a detecção de ácidos orgânicos. Os íons-alvo para esses ácidos foram malato 233, fumarato 245, succinato 247, citrato 273 e o padrão interno ribitol 319. Para a análise dos demais metabólitos, foi realizado um alinhamento utilizando o *software* MetAlign, seguido de uma análise na plataforma MetaboAnalyst. A identificação dos picos foi feita com o *software* NIST MSSEARCH e a biblioteca espectral NIST. A intensidade dos picos foi corrigida de acordo com as variações do padrão interno ribitol utilizado no experimento.

4.8 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise ultraestrutural, 1×10^4 células foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após infecção com ZIKV por 48h, as células foram lavadas com PBS e fixadas durante a noite a 4 °C em solução contendo 2% de paraformaldeído (v/v), 2% de glutaraldeído (v/v) e tampão de cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. Em seguida, as células foram pós-fixadas por 30 minutos em 2% de tetróxido de ósmio (w/v) e 0,8% de ferricianeto de potássio (10 mM de CaCl_2 em tampão de cacodilato de sódio 0,2 M). As amostras foram lavadas em água destilada e colocadas em acetato de urânio a 0,5% por 24 horas a 4 °C. O material foi desidratado em uma série graduada de acetona (50-100%) por 10 minutos cada. e embebidas na resina de Spurr. As seções ultrafinas foram contrastadas com acetato de urânio/citrato de chumbo e observadas em um TEM JEOL 100C e JEOL 1011 a 80 kV.

4.9 Análises estatísticas

Realizamos a análise estatística utilizando o GraphPad Prism v9.0.0. Para comparar as condições entre UNS e a condição infectada pelo ZIKV, utilizamos o teste t de Student para amostras independentes. A significância estatística foi considerada quando $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1. Micróglia infectadas pelo ZIKV apresentam translocação de NF- κ B para o núcleo e alterações morfológicas associadas à reorganização de β -tubulina

Modelos in vitro confiáveis são fundamentais para o estudo das respostas microgлияis em distúrbios do SNC, embora culturas imortalizadas não reproduzam totalmente a complexidade das micróglia presentes no cérebro. Recentemente, foi introduzida uma nova linhagem celular microglial humana (C20), derivada de cérebro adulto, que demonstrou potencial para estudos de fisiologia microglial por expressar marcadores morfológicos e imunológicos clássicos em resposta a diferentes estímulos (Davis et al., 2018; Gunasegaran et al., 2025). Assim, com o objetivo de investigar como o ZIKV altera a fisiologia microglial e explorar o possível envolvimento de distúrbios metabólicos e remodelação do citoesqueleto na patogênese viral, células C20 foram infectadas com ZIKV (MOI 1) por 48 horas.

Diferente do observado anteriormente em modelos neuronais (Luplertlop et al., 2017), onde a infecção pelo ZIKV induziu citotoxicidade, as micróglia infectadas mostraram aumento da viabilidade celular, sem sinais evidentes de dano, conforme indicado pela liberação inalterada de lactato desidrogenase (LDH) (Figuras 34A e 34B). Além disso, a infecção levou à redução da fluorescência do corante CFSE, sugerindo maior proliferação microglial (Figura 34C). Para avaliar se a viabilidade celular seria comprometida após um tempo mais prolongado de exposição viral, condição normalmente associada à citotoxicidade, células C20, SH-SY5Y (modelo neuronal) e células Vero (suscetíveis ao vírus) foram infectadas com ZIKV (MOI 1) por 96 horas (Figura 34D). Os dados mostraram uma redução de aproximadamente 50% na viabilidade das células neuronais e de 60% nas células Vero, enquanto as micróglia apresentaram apenas 20% de redução, sugerindo uma maior resistência à citotoxicidade induzida pelo vírus.

Com o objetivo de investigar se o ZIKV é capaz de modular parâmetros associados à ativação celular em micróglia, avaliamos a translocação do fator de transcrição nuclear NF- κ B do citoplasma para o núcleo, por microscopia confocal, 12 horas após a infecção (Figura 34E). Em células controle, a marcação de NF- κ B permaneceu predominantemente citoplasmática, enquanto nas células infectadas foi observada uma marcação nuclear aumentada, indicando a sua translocação para o núcleo.

Para investigar se a infecção pelo ZIKV também promove a remodelação do citoesqueleto e alterações morfológicas, foi realizada marcação de β -tubulina 48 horas após a infecção (Figura 34F). As células infectadas exibiram uma mudança clara na morfologia, com menor frequência de células ramificadas em comparação ao controle. Notavelmente, um padrão distinto de β -tubulina foi identificado nas células infectadas: a proteína passou de uma distribuição assimétrica para um acúmulo ao redor do núcleo. Esse rearranjo foi evidenciado pela intensificação da marcação de β -tubulina na região perinuclear em células infectadas em comparação às células controle. Esses dados reforçam o papel da reorganização da β -tubulina nas alterações morfológicas das micróglia durante a infecção e corroboram análises proteômicas prévias que identificaram a remodelação do citoesqueleto como uma via central enriquecida após exposição ao ZIKV (Corrêa, 2020). Os achados também levantam questões importantes sobre o impacto dessa reorganização na localização de outros compartimentos celulares, especialmente as mitocôndrias, que desempenham papel central na dinâmica celular durante processos inflamatórios e infecciosos. Diante disso, uma caracterização detalhada acerca da dinâmica mitocondrial durante a infecção pelo ZIKV será avaliada em tópicos posteriores.

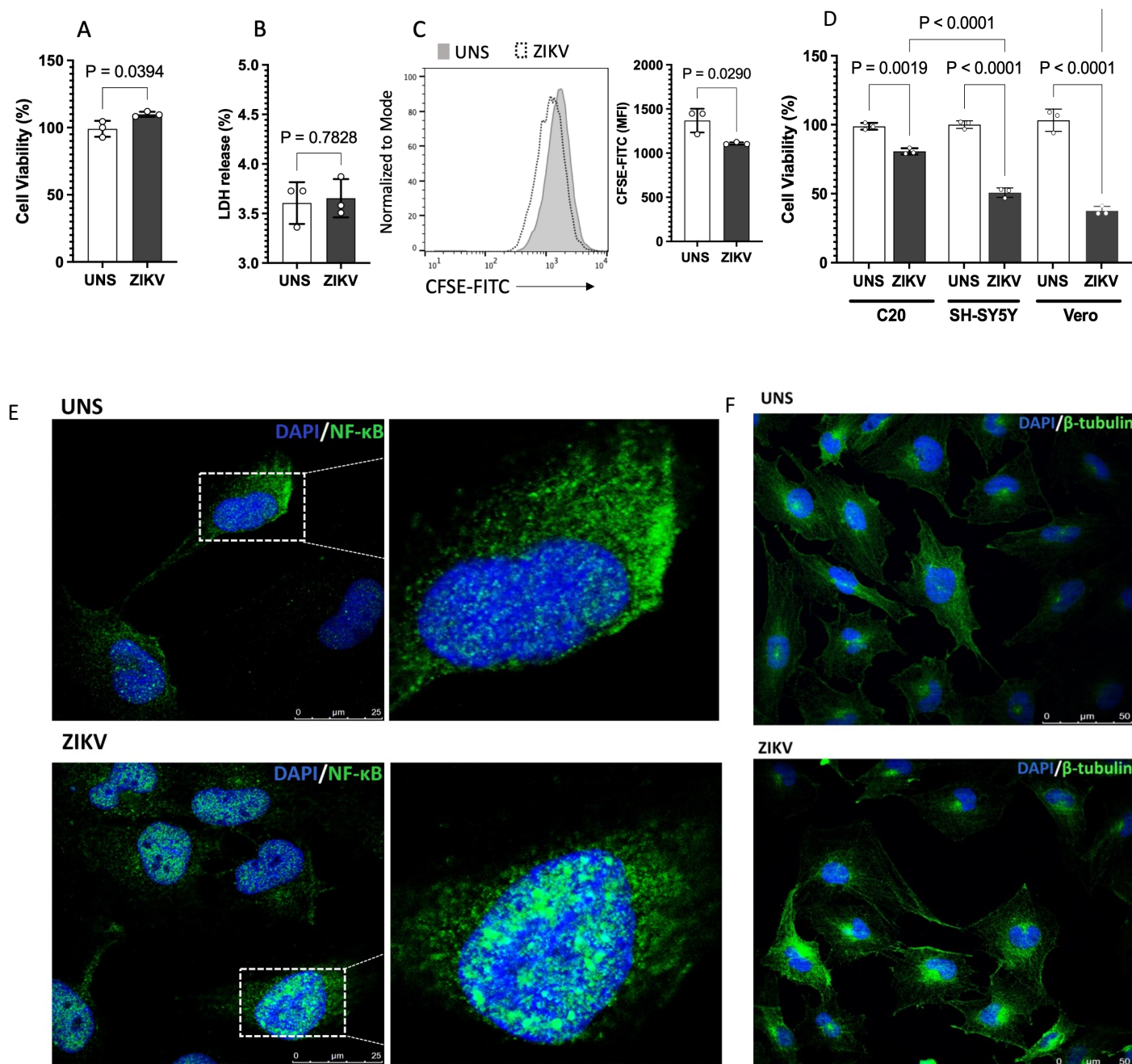


Figura 34: A infecção pelo ZIKV induz a formação de gotículas lipídicas, translocação do NF-κB e remodelação de β-tubulina em células microgliais. (A) Avaliação da viabilidade celular por ensaio de MTT e (B) níveis de liberação de LDH em células microgliais C20 infectadas com ZIKV (MOI 1) ou não estimuladas (UNS), após 48 horas. (C) Análise da proliferação celular por citometria de fluxo com CFSE, 48 horas após infecção. (D) Análise de viabilidade celular de células microgliais, neuronal-like e vero após 96h de infecção pelo ZIKV. (E) Translocação do NF-κB para o núcleo analisada por microscopia confocal (NF-κB em verde, núcleo em DAPI), 12 horas após infecção. (F) Microscopia de fluorescência com anticorpo anti-β-tubulina (verde) e DAPI (núcleo) para análise de alterações morfológicas nas células microgliais infectadas ou não com ZIKV. A análise estatística foi realizada pelo teste T Student, considerando a comparação entre os dois grupos.

5.2 Detecção do ZIKV na micróglia por RT-qPCR e microscopia eletrônica de transmissão

Diante da baixa perda de viabilidade observada nas micróglias expostas ao ZIKV, investigamos se o vírus estaria de fato sendo internalizado, ou se os baixos níveis de citotoxicidade refletiram apenas uma exposição viral sem a entrada efetivamente do vírus na célula. Para isso, realizamos a quantificação de RNA viral intracelular por RT-qPCR, que revelou níveis significativos de ZIKV 48 horas após a infecção (Figura 35A), indicando a presença do vírus no interior das células. Além disso, a microscopia eletrônica de transmissão confirmou esse achado ao visualizar partículas virais organizadas no citoplasma das micróglias infectadas (Figura 35B), padrão compatível com processos ativos de infecção viral. Esses dados reforçam que, mesmo em um contexto de baixa citotoxicidade, o ZIKV é efetivamente detectado de forma intracelular em micróglias, o que levanta questões relevantes sobre os mecanismos que sustentam essa infecção sem induzir morte celular acentuada.

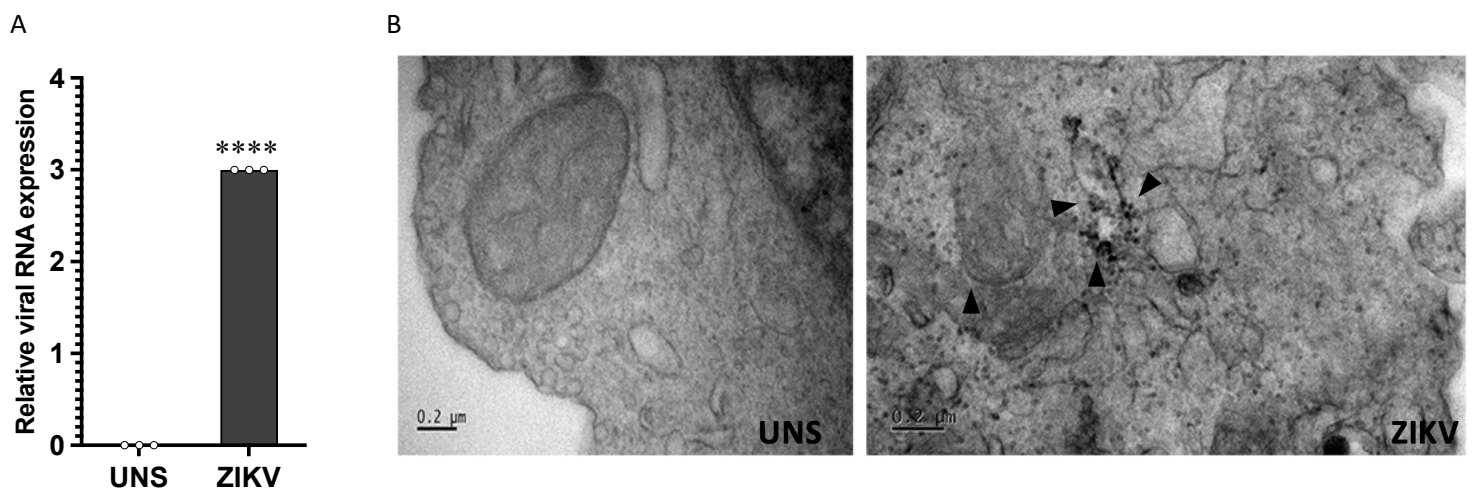


Figura 35: Detecção do ZIKV em células microgliais infectadas. (A) Quantificação do RNA viral por qPCR 48 horas após infecção das células C20 com ZIKV (MOI 1), confirmando a presença do vírus no interior das células. (B) Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão revelam partículas virais organizadas no citoplasma de micróglias infectadas, indicadas pelas setas pretas, compatíveis com infecção produtiva. Os dados reforçam que, mesmo com baixa citotoxicidade observada, o ZIKV é eficientemente detectado de forma intracelular em micróglias humanas.

5.3 Investigação da dinâmica mitocondrial em resposta à infecção pelo ZIKV em micróglia

A infecção pelo ZIKV já foi descrita como causadora de disfunções mitocondriais em células do tipo neuronal e astrócitos (Braz-De-Melo et al., 2019; Ledur et al., 2020), e esse processo estaria ligado a morte celular induzida pelo ZIKV nesses modelos. No entanto, os efeitos da infecção sobre a bioenergética das micróglia permanecem pouco explorado. A baixa citotoxicidade observada no tópico 5.1 sugere que as micróglia podem responder de forma diferente ao estresse viral, ativando adaptações metabólicas específicas para sustentar sua função e sobrevivência. Diante disso, buscamos investigar se a infecção pelo ZIKV modula aspectos da dinâmica e funcionalidade mitocondrial em micróglia humanas, como parte das estratégias celulares para manter a homeostase durante a infecção.

Com o objetivo de entender como a dinâmica mitocondrial pode ser afetada nas micróglia infectadas, a capacidade respiratória foi avaliada após 48 ou 96 horas pós-exposição ao ZIKV com MOI 1 (Figura 36A-D). Os dados mostraram que a respiração basal ou vinculada ao ATP permanece inalterada tanto 48 quanto 96 horas após a infecção. Surpreendentemente, quando a respiração máxima foi induzida por pulsos de CCCP, foi encontrado que as micróglia infectadas conseguem atingir uma capacidade respiratória aproximadamente 1,5 vezes maior em comparação ao controle, e essa relação se manteve por 96h pós-infecção. Além disso, um padrão semelhante foi observado ao analisar a capacidade respiratória de reserva, com as micróglia infectadas apresentando desempenho 1,5 vezes superior em comparação às células controle. Esses achados demonstram que, sob condições normais, as micróglia infectadas e controle apresentam padrões semelhantes de parâmetros bioenergéticos mitocondriais. No entanto, sob estresse ou demandas energéticas repentinamente aumentadas, as células infectadas seriam capazes de realizar uma função mitocondrial aprimorada, o que poderia ser importante para a manutenção da viabilidade celular.

Para investigar a distribuição das mitocôndrias nas micróglia infectadas, as células foram marcadas com MitoTracker Red CMXRos e analisadas por microscopia confocal (Figura 36E). Nas células controle, as mitocôndrias estavam amplamente distribuídas por todo o corpo celular. Em contraste, as células infectadas mostraram um acúmulo de mitocôndrias na região perinuclear. Além disso, um aumento na intensidade de fluorescência foi observado em células infectadas, ressaltando que estas poderiam ter um maior número de mitocôndrias viáveis (Figura 37A). Para um melhor entendimento, as células microgliais foram examinadas por

microscopia eletrônica de transmissão (Figura 36F). A análise revelou um aumento no conteúdo mitocondrial nas células infectadas pelo ZIKV em comparação às células controle, demonstrado pela maior frequência dessas organelas no citoplasma. Notavelmente, houve diferenças marcantes na morfologia mitocondrial entre os dois grupos. As células não-infectadas continham predominantemente mitocôndrias alongadas (indicadas por Δ), enquanto as células infectadas exibiram um número maior de mitocôndrias menores (indicadas por *). Esses achados indicam que a micróglia altera a organização e a morfologia mitocondrial em resposta à infecção do ZIKV, o que pode ser importante para a maior resistência comparada às outras linhagens mais suscetíveis ao vírus.

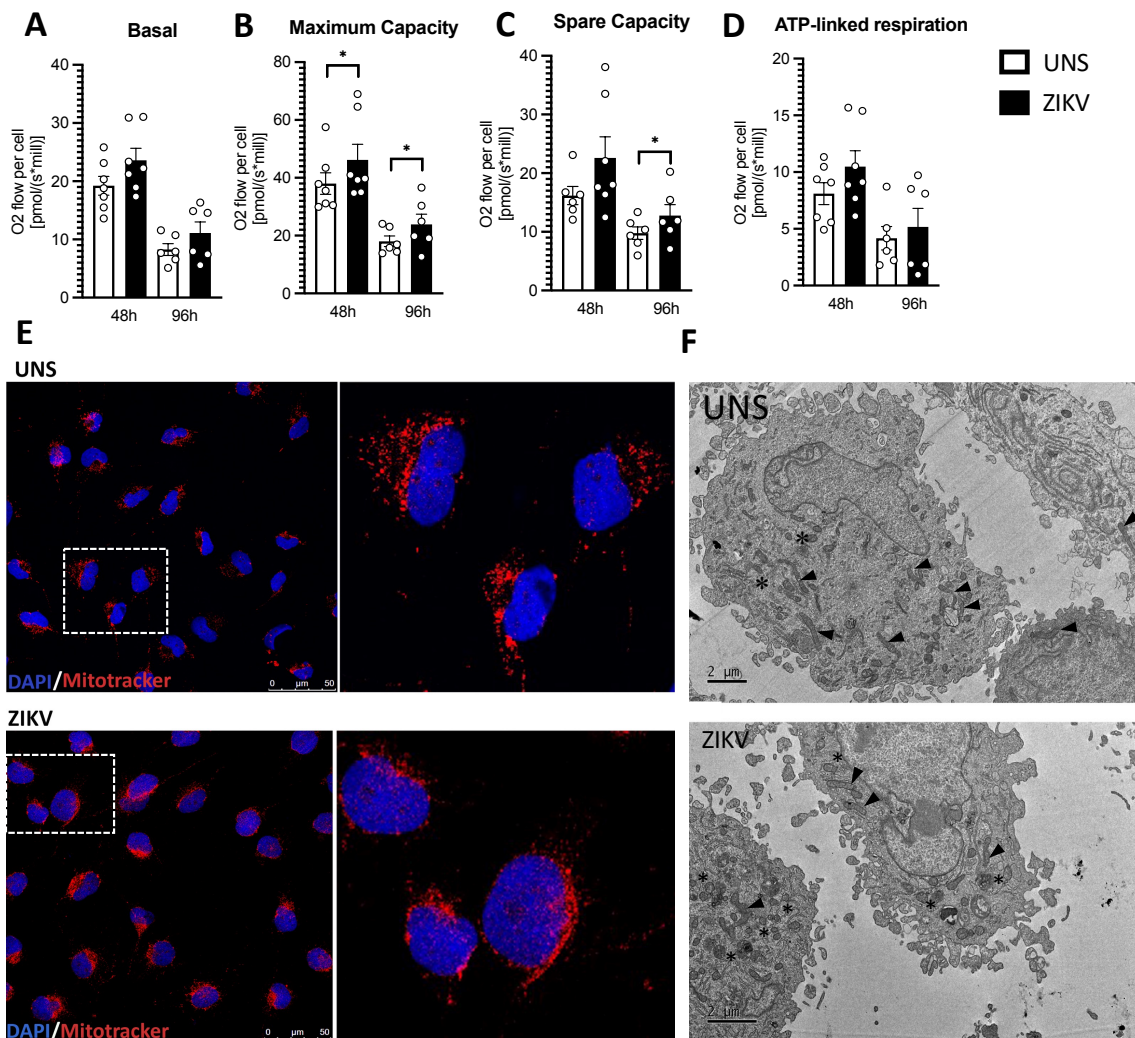


Figura 36: Avaliação da dinâmica mitocondrial durante a infecção com ZIKV. (A-D) A linhagem de micróglia humana C20 foi infectada com MOI 1, e após 48h ou 96h, a função mitocondrial foi avaliada por respirometria de alta resolução. (E) Marcação de mitocôndrias viáveis pela sonda MitoTracker Red (em vermelho) e o núcleo e marcado com DAPI (azul). (F) Visualização de mitocôndrias por MET. Em (f), as setas indicam mitocôndrias alongadas, enquanto asteriscos indicam mitocôndrias de tamanho encurtado. A análise estatística foi realizada pelo teste Two-Way ANOVA, comparando as condições controle e infectadas, bem como em relação ao tempo de infecção. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (*), no qual * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (a-d).

5.4 Investigação das adaptações metabólicas após a exposição ao ZIKV em células microgliais

Com base nos achados que indicam aumento no desempenho mitocondrial e no número geral de mitocôndrias, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada e se mostrou reduzida durante a infecção pelo ZIKV em pontos iniciais (24 a 72 horas). No entanto, isso foi seguido por um aumento na produção de ROS após 96 horas, o que pode ser atribuído a fontes citoplasmáticas (Figuras 37B-D), um processo comumente observado em períodos prolongados de ativação celular.

Existe uma relação intrincada entre a dinâmica mitocondrial e as infecções, na qual tanto a célula hospedeira quanto o patógeno podem induzir adaptações celulares como medidas protetoras ou estratégias de evasão imunológica, respectivamente. Como a função e morfologia mitocondrial foram alteradas durante a infecção, a detecção de metabólitos relacionados ao metabolismo da glicose foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) para investigar as consequências dos parâmetros mitocondriais alterados. Os resultados mostraram uma abundância elevada de metabólitos do ciclo do ácido cítrico ou tricarboxílico (TCA) nas células infectadas, como succinato, malato, fumarato e citrato (Figuras 37E-H). Importante, a abundância de glicose intracelular foi diminuída após a infecção, sugerindo maior consumo em comparação às células controle (Figura 37I). O aumento no metabolismo da glicose, seguido pelo acúmulo de intermediários do ciclo do TCA, é frequentemente observado durante a glicólise aeróbica, onde as células reduzem a OXPHOS e aumentam a taxa de glicólise, mesmo na presença de oxigênio. No entanto, a respirometria de alta resolução revelou que a OXPHOS não foi comprometida, apesar do acúmulo dos intermediários do ciclo do TCA (Figura 36A-D). Para identificar possíveis metabólitos responsáveis por manter a OXPHOS e a produção de ATP, o perfil metabólico foi avaliado. Foi observada uma leve diminuição na abundância de glutamato, sugerindo aumento no consumo desse aminoácido, o que pode estar relacionado ao seu papel em sustentar a OXPHOS e a integridade mitocondrial nas células infectadas (Figura 37J). Outros aminoácidos que poderiam exercer essa função de sustentar a OXPHOS foram avaliados, como a valina e alanina, mas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. O conjunto de dados indica que o ZIKV altera o perfil metabólico das células microgliais, favorecendo o metabolismo rápido da glicose, mas sustentando a OXPHOS e a função mitocondrial por meio

do consumo de glutamato. Tal mecanismo pode ser essencial para a capacidade dessas células de permanecerem funcionais e viáveis, servindo como sítio de replicação viral *in vitro*, além de poder representar um mecanismo importante para a manutenção prolongada de micróglias ativadas após a exposição ao ZIKV, amplificando a neuroinflamação e a excitotoxicidade frequentemente associadas a esse patógeno.

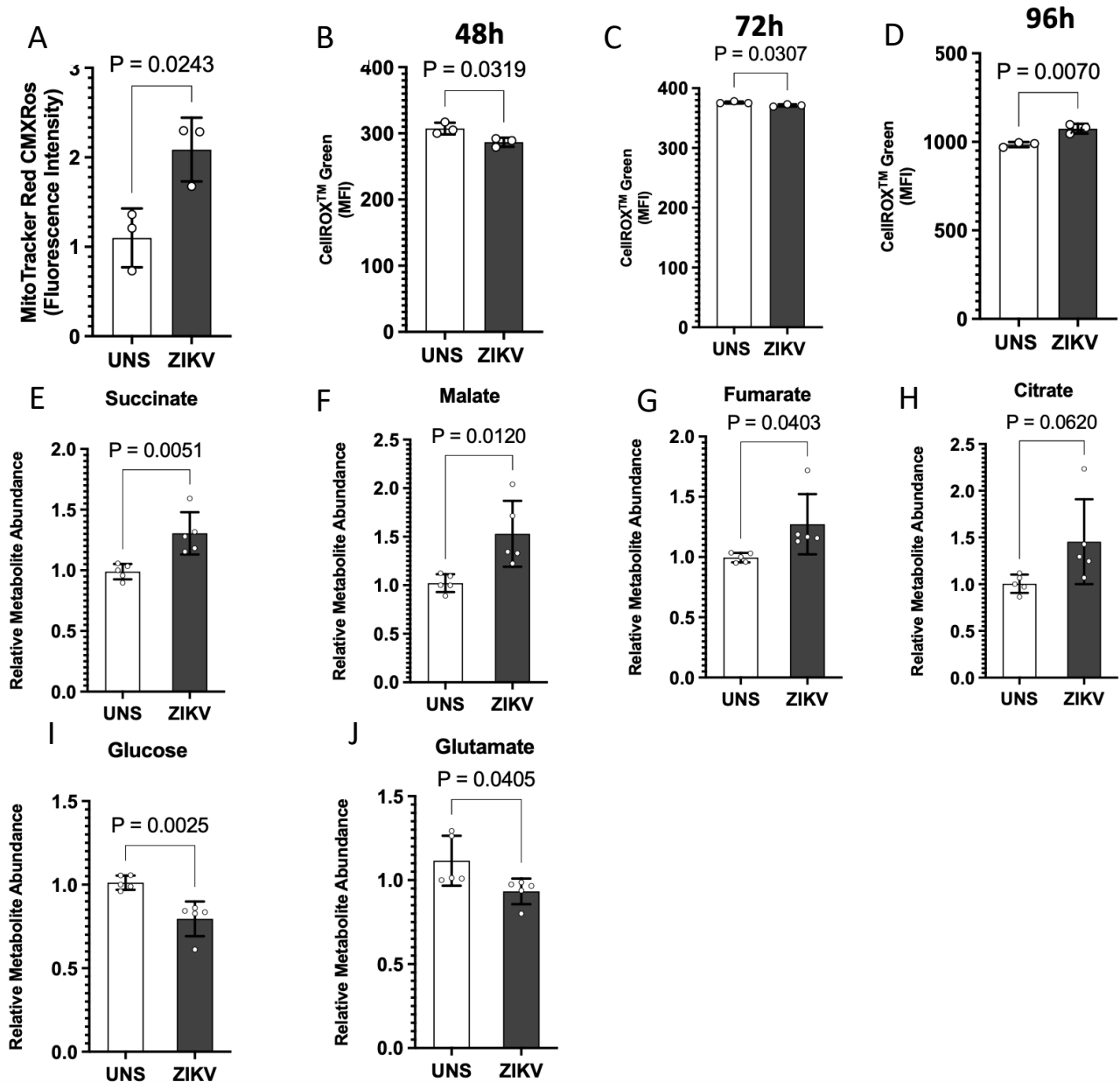


Figura 37: Avaliação das adaptações metabólicas da micróglia após a infecção com o ZIKV. (A) Quantificação da intensidade de fluorescência do MitoTracker Red. (B-D) Produção de ROS em diferentes tempos pós-infecção (24, 72 e 96h). (E-J) Perfil metabólico obtido por GC-MS detectando metabólitos do ciclo do TCA (succinato, malato, fumarato e citrato), glicose e glutamato. A análise estatística foi realizada pelo teste T Student, considerando a comparação entre os dois grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6. Discussão

No capítulo 2 desta tese, foi fornecido evidências experimentais de que o ZIKV induz alterações funcionais e metabólicas relevantes em micróglia humana. Considerando a reconhecida plasticidade dessas células frente às alterações ao microambiente, como em casos de infecções, investigamos se a exposição ao vírus poderia desencadear adaptações que mantivessem a viabilidade celular, mesmo diante de infecção dessas células. De fato, observamos que, apesar da detecção intracelular do vírus, as micróglia mantêm alta viabilidade, acompanhada de aumento na capacidade respiratória mitocondrial máxima, proliferação celular e uma distribuição diferencial de mitocôndrias no citoesqueleto. A redução nos níveis intracelulares de glicose e glutamato, associada ao acúmulo de intermediários do ciclo do TCA, reflete um perfil metabólico compatível com alta demanda energética. Ainda assim, a OXPHOS mitocondrial se manteve preservada, sugerindo que as micróglia são capazes de ajustar seu metabolismo de forma eficiente durante a infecção, mesmo apresentando sinais clássicos de ativação celular. Esses dados indicam que, além de participarem ativamente da resposta imune no SNC, as micróglia podem servir como sítios permissivos à replicação viral, contribuindo tanto para a manutenção da infecção quanto para a amplificação de processos neuroinflamatórios associados ao ZIKV.

Ao contrário de neurônios e astrócitos (Braz-De-Melo et al., 2019; Ledur et al., 2020), demonstramos que micróglia humana imortalizada derivadas de cérebro adulto possuem maior capacidade de manter a viabilidade celular ao longo da infecção pelo ZIKV, resultados alinhados a um estudo publicado anteriormente (F. B. C. de Oliveira et al., 2023). As micróglia infectadas apresentaram características clássicas de ativação celular, como aumento da proliferação e translocação nuclear do NF- κ B, mantendo a viabilidade nas fases iniciais e evitando perda celular excessiva em tempos mais prolongados, quando comparadas às células de linhagem *neuronal-like*. A exposição ao ZIKV também levou a alterações morfológicas significativas, com a transição de uma morfologia ramificada para uma configuração de menor nível ramificação, se aproximando a uma morfologia mais ameboide, característica típica de micróglia ativadas (Rosito et al., 2023). Notavelmente, a marcação de β -tubulina revelou um acúmulo pronunciado da proteína na região perinuclear das células infectadas, enquanto nas células controle a distribuição da β -tubulina era mais homogênea ao longo do citoplasma. Esse

fenótipo está de acordo com padrões previamente descritos de dinâmica do citoesqueleto de microtúbulos, reconhecidos como marcadores de micróglia reativas estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS) e interferon- γ (Rosito et al., 2023). A remodelação do citoesqueleto é fundamental para que micróglia e macrófagos adquiram morfologias distintas (Seta et al., 2023), sendo que a rede de tubulina desempenha papel central nos processos organização dos microtúbulos. Esse processo é regulado por proteínas associadas a microtúbulos (MAPs), que, coincidentemente, foram encontradas enriquecidas em cérebros de camundongos infectados pelo ZIKV, segundo dados obtidos em uma análise proteômica do grupo em um trabalho desenvolvido anteriormente (Corrêa, 2020). Esses achados destacam o papel essencial dos componentes do citoesqueleto na adaptação morfológica das micróglia frente à infecção pelo ZIKV, reforçando a importância das vias de organização celular como parte da resposta microglial à infecção.

A infecção pelo ZIKV em micróglia também foi associada a alterações na dinâmica mitocondrial, incluindo mudanças na distribuição e morfologia dessas organelas. Notavelmente, observou-se um acúmulo perinuclear distinto de mitocôndrias nas células infectadas, um fenótipo previamente descrito em células A549 infectadas pelo vírus sincicial respiratório (RSV) (M. Hu et al., 2019). Essa reorganização mitocondrial pode estar relacionada ao aumento da proliferação microglial observado neste estudo, uma vez que padrões semelhantes de agrupamento mitocondrial foram descritos em células musculares lisas em proliferação, onde o posicionamento dinâmico das mitocôndrias acompanha mudanças morfológicas e aumento da motilidade celular (Chalmers et al., 2012). Além da alteração na distribuição, a infecção pelo ZIKV induziu um aumento na abundância de mitocôndrias de menor tamanho, ou encurtadas, uma característica que pode ter importantes implicações funcionais. Existem hipótese que trabalham a possibilidade de mitocôndrias menores, geradas por fissão, por exemplo, facilitem processos de reparo, contribuindo para amenizar danos e preservar a função respiratória sob condições de estresse (Horn et al., 2020). Essa adaptação pode representar um mecanismo protetor, assegurando a integridade e funcionalidade mitocondrial frente ao estresse celular induzido pelo ZIKV. Esses achados destacam a notável plasticidade mitocondrial e reforçam a redistribuição diferencial dessas organelas em micróglia ativadas e proliferativas. As adaptações mitocondriais durante a infecção e sugerem que o remodelamento mitocondrial pode desempenhar um papel crucial na manutenção da homeostase celular em resposta ao desafio viral.

A disfunção mitocondrial e a reprogramação metabólica são características comuns observadas após a infecção do ZIKV em vários tipos celulares, como trofoblastos (Q. Chen et al., 2020b), células neuronais (Braz-De-Melo et al., 2019) e astrócitos (Ledur et al., 2020), mas pouco se sabe como essa infecção afetaria os grandes sensores do SNC ao ambiente, que são as micróglias. Células imunológicas frequentemente passam por um *shift* metabólico, mudando da fosforilação oxidativa (OXPHOS) para glicólise aeróbica durante a ativação celular, para atender ao aumento imediato na demanda energética e fornecer precursores biossintéticos necessários para funções pró-inflamatórias (N. Kim et al., 2024; Lan et al., 2024; Orihuela et al., 2016; L. Wang et al., 2019). Uma consequência que comumente ocorre em resposta a esse processo é a disfunção mitocondrial, que, a longo prazo, pode levar a danos celulares e a morte da célula (Bernier et al., 2020). Curiosamente, infectando células microgliais *in vitro* com ZIKV, demonstramos que a função mitocondrial permaneceu intacta mesmo em estágios tardios da infecção, alinhada a uma manutenção da viabilidade celular e replicação viral, sugerindo uma importante adaptação da micróglia durante a infecção.

Nesse aspecto, é essencial reconhecer que, além do reprogramamento metabólico associado à ativação inflamatória clássica de células imunes, infecções virais por si frequentemente redirecionam o metabolismo celular para favorecer sua replicação (Palmer, 2022). Este é um ponto crítico para expandir a discussão sobre como a micróglia poderia exibir padrões metabólicos distintos além das diferenças esperadas entre os estados de repouso (OXPHOS) e ativação (glicólise aeróbica), pois a presença do patógeno pode induzir perfis metabólicos únicos que beneficiam o curso da infecção, e ao mesmo tempo, podem impactar a fisiologia da célula hospedeira (Orihuela et al., 2016; Palmer, 2022). Por exemplo, a infecção crônica pelo citomegalovírus humano (HCMV) aumenta a biogênese mitocondrial mesmo sob glicólise aeróbica intensificada (Kaarbø et al., 2011). Esse processo inclui maior atividade mitocondrial, impulsionada principalmente pela conversão de glutamina a glutamato, seguido de conversão a α -cetoglutarato, que alimenta o ciclo do TCA durante a glicólise aeróbica. Dessa forma, o vírus promove tanto a glicólise aeróbica quanto a OXPHOS funcionando paralelamente, uma estratégia crucial para sua replicação (Kaarbø et al., 2011; Karniely et al., 2016; Palmer, 2022). Vale destacar que, de forma similar ao que foi descrito para o HCMV, nós identificamos aqui uma redução de glutamato no perfil metabólico da linhagem microglial infectada pelo ZIKV. Curiosamente, um estudo recente da infecção com ZIKV em células JEG-3 demonstrou que ao

inibir a respiração mitocondrial com uso de rotenona, os autores observaram uma supressão da replicação viral, ressaltando a dependência da manutenção da OXPHOS para atingir os requerimentos necessários para que o vírus complete o seu ciclo (Michita et al., 2025). Os achados dessa sessão têm o potencial de se alinhar também aos dados *in vivo* do capítulo 1 dessa tese, que mostraram um aumento na expressão da enzima glutaminase no cérebro da prole fêmea exposta ao ZIKV durante a gestação. A adaptação metabólica pode ser um mecanismo estratégico do ZIKV para equilibrar a ativação microglial e o reprogramamento metabólico, favorecendo tanto a modulação da resposta imune quanto a replicação viral. Os dados encontrados sugerem novos desfechos, especialmente ao se expandir a discussão para modelos *in vivo*, indicando um possível mecanismo de manutenção da neuroinflamação por meio da preservação da viabilidade e metabolismo da micróglia, o que permitiria sua ativação prolongada no SNC.

7. Conclusões e perspectivas

Em conclusão, neste capítulo demonstrou que a infecção pelo ZIKV induz adaptações metabólicas e morfológicas significativas nas células microgliais humanas. Ao contrário de outras células do SNC, a micróglia manteve a função mitocondrial e a viabilidade durante o curso da infecção, exibindo respiração mitocondrial máxima aprimorada e reprogramação metabólica que sustentou tanto a ativação celular quanto a replicação viral. A infecção pelo ZIKV levou à remodelação do citoesqueleto por meio da reorganização da β -tubulina, o que caracterizou um fenótipo com menos ramificações, similar ao encontrado no perfil ameboide. Apesar da indicação de uma mudança para a glicólise aeróbica devido à redução da abundância de glicose intracelular, o que indica o seu consumo, e ao acúmulo de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), a micróglia infectada pelo ZIKV exibe capacidade respiratória aumentada e abundância de mitocôndrias de tamanho menor na região perinuclear. O acúmulo de citrato, succinato e malato, enquanto mantém a função mitocondrial, sugere uma importante adaptação metabólica em direção a vias biossintéticas que sustentam a viabilidade celular sob estresse. A diminuição da abundância intracelular de glutamato é um indicativo de suporte à manutenção do metabolismo oxidativo mitocondrial. Essas descobertas destacam que a capacidade da micróglia de equilibrar as demandas metabólicas enquanto preserva a função mitocondrial pode ser fundamental para sua resistência durante a infecção, sustentando a funcionalidade celular e, ao mesmo tempo, moldando a capacidade geral da micróglia de servir como reservatório viral.

Como importante perspectiva, embora tenha sido sugerido que a micróglia atua como reservatório viral *in vitro*, ainda não está claro se ela desempenha esse papel *in vivo*. São necessários

outros modelos experimentais para compreender as implicações clínicas da microglia como reservatório cerebral e seu papel específico na progressão da doença durante a infecção pelo ZIKV.

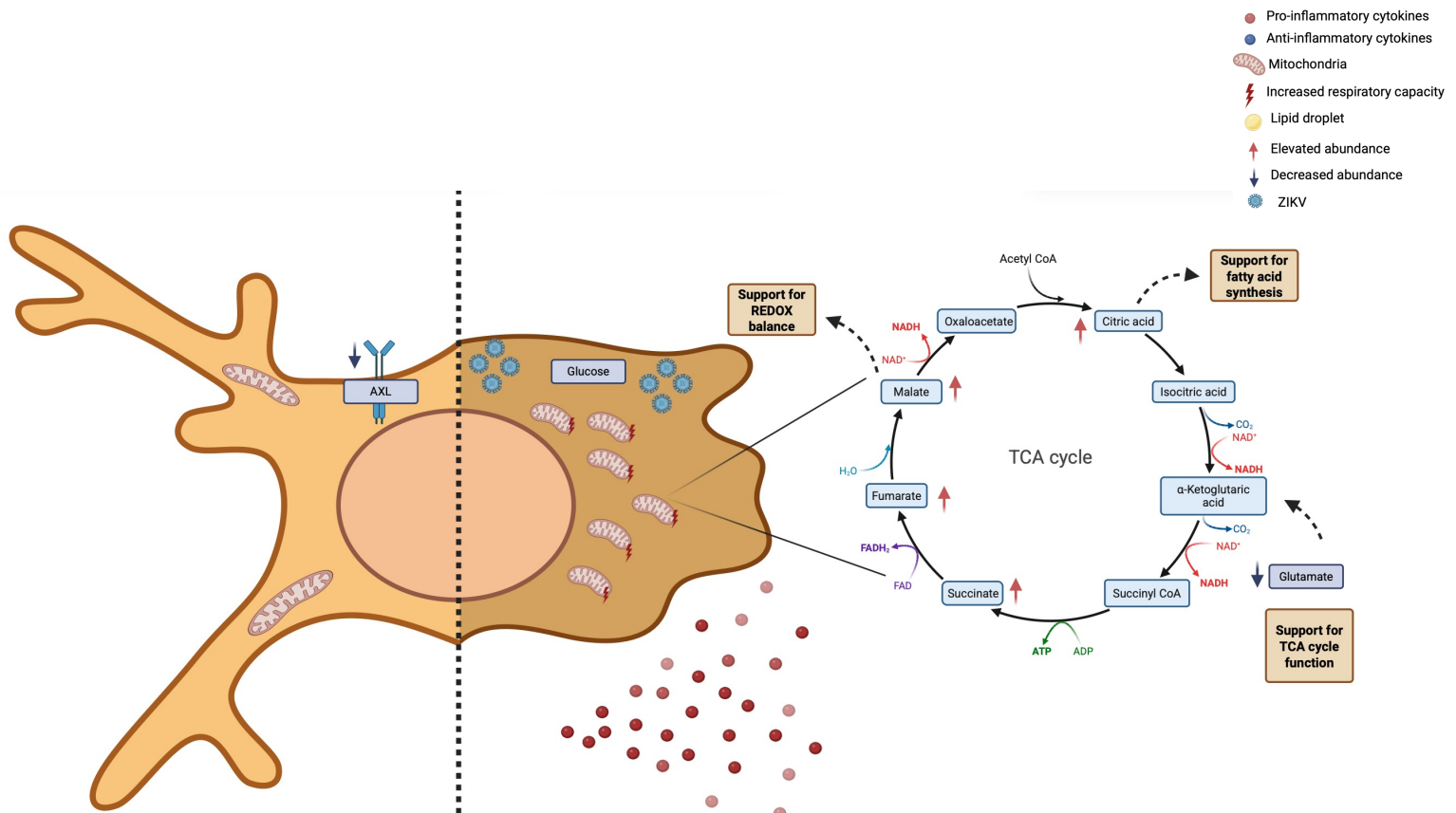


Figura 38. Modelo proposto para as adaptações metabólicas adotadas pela microglia em resposta à infecção do ZIKV. A Este esquema ilustra o modelo proposto de reprogramação metabólica induzida pelo ZIKV do metabolismo mitocondrial na microglia durante a infecção. As células infectadas demonstraram um fenótipo semelhante ao amebóide, um aumento no número de mitocôndrias de tamanho menor na região perinuclear, que apresentavam uma capacidade respiratória máxima aumentada. A infecção levou a um aumento do consumo da glicose intracelular e ao acúmulo de intermediários-chave do ciclo do TCA, como citrato, succinato, fumarato e malato (marcados por setas vermelhas). Hipotetizamos que o citrato é redirecionado para apoiar a síntese de ácidos graxos, enquanto o malato contribui para o equilíbrio redox. A diminuição observada no glutamato pode refletir sua conversão em α -cetoglutarato, sustentando o fluxo do ciclo de TCA por meio de vias anapleróticas. Apesar dessas alterações, a fosforilação oxidativa permaneceu funcional, permitindo que a microglia atendesse às necessidades energéticas para promover a replicação viral e a sobrevivência celular.

Produções acadêmicas durante o doutorado

Minor Reviews at Molecular Neurobiology

Title

Zika virus reprograms microglial mitochondrial metabolism to support immune activation and viral replication: Omega-3 DHA counteracts neuroinflammation and viral persistence

Authors

Heloísa Antoniella Braz-de-Melo¹, Fernanda Gomes Lago¹, Rafael Corrêa², Igor de Oliveira Santos¹, Paula Maria Quaglio Bellozi³, Raquel das Neves Almeida⁴, Wagner Fontes¹, Mariana de Sousa Castro¹, Aline Maria Araújo Martins⁵, Raphaela Meneses Oliveira¹, Nadia Martins Serpa Rossi⁶, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento¹; Ana Luiza Gouvea¹ Paulo Sousa Prado⁶, Andreza Fabro de Bem³, Sônia Nair Bão¹, Bergmann Morais Ribeiro¹, Stevens Kastrup Rehen⁷, Thomas Christopher Williams⁸, Gary P. Kobinger⁹, Kelly Grace Magalhães¹

Microglial cells exhibit crucial metabolic adaptations to maintain neural homeostasis. However, their dysregulated activation during infections can lead to neurotoxicity and contribute to neuroinflammatory disorders. Understanding microglial physiological and metabolic changes during immune activation is essential for identifying protective targets against neuroinflammation. This study investigates how Zika virus (ZIKV) alters microglia metabolism during inflammation, highlighting cellular adaptations that sustain oxidative metabolism linked to cell survival throughout cellular activation and viral replication. After identifying an enriched abundance of proteins related to oxidative phosphorylation and cellular component organization in the global proteomics of mouse brains following ZIKV exposure, we investigated the relevance of these pathways during *in vitro* infection of human microglia. ZIKV infection led to cytoskeleton remodeling via β -tubulin reallocation, which characterized an ameboid-like phenotype. Despite the indication of a shift toward aerobic glycolysis due to decreased intracellular glucose, which indicates its consumption, and accumulation of tricarboxylic acid cycle (TCA) intermediates, ZIKV-infected microglia exhibit enhanced respiratory capacity and abundance of smaller-sized mitochondria in the perinuclear region. The accumulation of citrate, succinate, and malate, while maintaining mitochondrial function, suggests an important metabolic adaptation towards biosynthetic pathways that sustain cell viability under stress. Decreased intracellular glutamate abundance supports mitochondrial oxidative metabolism. Pre-treatment with the anti-inflammatory Docosahexaenoic Acid (DHA) mitigates ZIKV-induced metabolic alterations by reducing pro-inflammatory markers, downregulating viral entry receptors, and lowering microglial activation and viral load. This study reveals that while ZIKV induces cell death in neuronal-like cells, the mitochondrial adaptation observed in microglial infection could be a key to maintaining cell survival throughout neuroinflammation. Our findings elucidate a novel cellular adaptation during ZIKV infection involving β -tubulin reorganization and metabolic dynamics, reflecting microglial flexibility and resistance during neuroinflammation, and demonstrating the therapeutic potential of DHA in mitigating ZIKV-induced pathology.

Title

Anti-tumor activity of secretome of brown adipose tissue against breast cancer is dependent on caspase-1/11

Luís Henrique Corrêa¹⁺, Heloisa Antoniella Braz-de-Melo¹⁺, Igor de Oliveira Santos¹, Raquel das Neves Almeida¹, Dalila Juliana Silva Ribeiro¹, Tiago Medeiros Furquim¹, Lívia Pimentel de Sant'Ana¹, Matheus Garcia de Fragas², Niels Olsen Saraiva Câmara², Mariana S. Castro³, Wagner Fontes³, Dario Simões Zamboni⁴, Kelly Grace Magalhães^{1*}

This study investigated whether secretory products from white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) influence breast cancer carcinogenic parameters and evaluated the role of caspase-1/11 proteins in modulating the endocrine function of these tissues. Conditioned media (CM), the secretome, derived from BAT or WAT of wild-type (WT) or caspase-1/11 knockout (KO) mice, were used to stimulate the triple-negative breast cancer cell line 4T1. WAT-derived CM increased pro-tumorigenic properties, such as cell proliferation and lipid droplet biogenesis, suggesting a pro-tumoral effect. In contrast, BAT-derived CM showed antitumoral activity by reducing proliferation and inducing cytotoxicity and oxidative stress. These effects were enhanced in the absence of caspase-1/11 or when CM was obtained from cold-exposed animals, increasing lytic cell death. Both WAT- and BAT-derived CM induced significant changes in the global proteomic profile of 4T1 cells, particularly in pathways related to proliferation and metabolism. Interestingly, adipose tissues from caspase-1/11 KO mice showed reduced inflammatory markers, suggesting changes in their secretory profile. Our findings indicate that WAT secretions may promote breast cancer aggressiveness, whereas BAT secretions exert protective, antitumoral effects. Importantly, caspase-1/11 proteins appear to modulate this endocrine function, positioning them as potential targets for reprogramming adipose tissue activity in cancer contexts

Title

DHA-enriched fish oil supplementation modulates adipose tissue and induces an anti-tumor effect of brown adipose tissue-derived secretome against melanoma cells

Débora Santos da Silva¹⁺, Heloísa Antoniella Braz-de-Melo¹⁺, Luana Borges Baptista²,
Nathalia Cristina Silva Lago¹, Ramon Buson de Lima Paiva¹, Gabriel Pasquarelli do
Nascimento¹, Nathalia Pizato³, Kelly Grace Magalhães¹

While long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are known for their anti-inflammatory properties in experimental models, the metabolic and functional consequences of fish oil supplementation in the adipose tissue remain under investigation. Also, modulating the adipokine secretome with PUFAs dietary interventions may alter signaling that controls melanoma cells. This study evaluated the effects of a 1 g/kg fish oil enriched in DHA (DHA:EPA ratio of 5:1) as dietary supplementation in C57BL/6 adult female mice over 5 weeks. We assessed systemic inflammation via cytokine profiling and peritoneal immune cell analysis, examined adipose tissue morphology through histology, and explored adipose tissue secretory activity by applying conditioned media (CM) from adipose depots to melanoma cells in vitro. DHA-enriched fish oil supplementation significantly reduced systemic inflammatory markers, decreased total adipose tissue mass, and induced depot-specific reductions in adipocyte size. Importantly, secretomes derived from both white (WAT) and brown (BAT) adipose tissues of DHA-enriched omega-3 supplemented mice exhibited anti-tumor activity, with BAT-CM displaying pronounced cytotoxic effects against melanoma cells. Additionally, both WAT- and BAT-derived CM suppressed IL-6 production by melanoma cells, suggesting a potential mechanism for tumor microenvironment modulation. These findings reveal that DHA-enriched fish oil reshapes adipose tissue function through lipid-sensitive mechanisms and alters adipose-tumor communication via secreted bioactive factors. Our study provides new insights into the systemic impact of omega-3 lipid supplementation on adipose tissue-derived lipid signaling and its implications for cancer progression.

Title

The omega-3 docosahexaenoic acid triggers caspase-1-dependent pyroptotic cell death and mitochondrial dysfunction in A2780 human ovarian cancer cells

Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento^{1*}; Sarah Pinho Bezerra¹, Júlia Perin Manchine¹, Nathalia Cristina Silva Lago¹, Heloísa Antoniella Braz-de-Melo¹; Nathalia Soares da Cruz¹, Paula Bellozi², Amanda Pereira Rocha³, , Igor de Oliveira Santos¹, Fernanda Gomes Lago¹, Sabrina Azevedo Machado¹, Andreza Fabro de Bem², André Moraes Nicola³, Kelly Grace Magalhães^{1*}

Cancer is a leading cause of mortality worldwide, profoundly impacting global health and the economy. Among gynecologic malignancies, ovarian cancer has one of the highest mortality rates due to challenges in early diagnosis, limited targeted therapies, and frequent development of chemoresistance. Docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA), has been associated with anti-tumor properties, including modulation of cell cycle progression, invasiveness, and cell death in various cancer models. Previous research from our group demonstrated that DHA induces pyroptosis in human breast cancer cells. Pyroptosis, a lytic form of programmed cell death, is characterized by caspase-1 activation, membrane integrity loss, and the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs). In this study, we investigated the effects of DHA on the human ovarian cancer cell line A2780, focusing on cell death mechanisms, oxidative stress, and mitochondrial function. We found that DHA reduces A2780 cell proliferation and induces lytic cell death in a caspase-1-dependent manner. DHA treatment also increases reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial superoxide levels from early time points. Moreover, DHA disrupts mitochondrial function, as evidenced by a significant decrease in mitochondrial spare respiratory capacity (SRC), which is also dependent on caspase-1 activation. Our findings suggest that DHA compromises ovarian cancer cell viability by inducing pyroptosis and mitochondrial dysfunction through a caspase-1-dependent mechanism. These results contribute to a growing body of evidence supporting the potential of DHA as an anti-cancer agent and highlight the need for further investigation into its therapeutic applications in ovarian cancer.

Title

**DICER-Driven Regulation of Lipid Metabolism and Macrophage-Adipocyte Crosstalk
in Partial Lipodystrophy**

Andréa L. Rocha^{1,2,3}, Rhaissa Godoi^{1,2}, Tanes Imamura de Lima⁴, Diogo de Moraes^{1,2}, Bruna Brasil Brandão⁵, Antonio M. Pinto^{3,6}, Heloísa Antoniella Braz-de-Melo⁷, Felipe Corrêa da Silva⁷, Tiago Tomazini Gonçalves⁹, Letícia de Souza Figueiredo^{1,10}, Niedson Correia de Lima Junior¹, Luiz Osório Leiria⁹, Jan-Wilhelm Kornfeld^{11,12}, Kelly Grace Magalhães⁷, Pedro Manuel Morais-Veira^{2,4,7,13}, Alan Saghatelian^{3,6}, Marcelo A. Mori^{1,2,4,10,13,*}

Partial lipodystrophy is characterized by abnormal fat distribution, impaired thermogenesis, systemic inflammation, and diminished capacity for microRNA biogenesis in adipose tissue. Using DICER-deficient models to selectively disrupt microRNA biogenesis in adipocytes, we identified early metabolic and inflammatory alterations that coincide with the onset of partial lipodystrophy. DICER deficiency in adipocytes impaired lipid metabolism, leading to increased secretion of saturated lipids and triglycerides while reducing the biosynthesis of anti-inflammatory lipids. These changes promoted a pro-inflammatory environment by reprogramming macrophages to secrete IL-1 β . In turn, this proinflammatory environment impaired the thermogenic capacity of adipocytes. Lipidomic analyses revealed reduced levels of docosahexaenoic acid (DHA) and other polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in DICER-deficient adipocytes, accompanied by increased expression of genes encoding CYP450 enzymes linked to lipid degradation and reduced DHA biosynthesis. Co-culture experiments confirmed that DICER-deficient adipocytes exacerbate macrophage-driven inflammation and thermogenic suppression. Notably, DHA supplementation mitigated macrophage activation and inflammation induced by conditioned media from DICER-deficient adipocytes. These findings reveal a critical role for adipose tissue DICER in regulating lipid metabolism, macrophage-adipocyte interactions, and thermogenic function, offering new insights into molecular mechanisms driving lipodystrophy-associated metabolic disorders.

Under preparation

Exploring the maternal-fetal interface and sex-based susceptibility to dissect Zika Virus pathogenesis in the offspring

Heloisa Antoniella Braz de Melo¹; Shanshan Zhang²; Ines Zalonisk²; Fernanda Gomes Lago¹;
Jun R. Huh² and Kelly Grace Magalhaes¹

Under preparation

Delicate balance of immune activation and regulation in pregnancy

Shanshan Zhang, Jinseok Park, Changhon Lee, Ines Zalosnik, Heloisa Antoniella Braz-de-Melo, Christophe Benoist and Jun R Huh

Under preparation

Secretomes from brown and white adipose tissue lacking DICER impair mitochondrial function and promote inflammatory cell death in insulinoma cells

Gabriella Simões Heyn¹, Gabriel Pasquarelli-do-Nascimento¹, Milena Nascimento Verdam de Araújo¹, Heloisa Antoniella Braz-de-Melo¹, Sabrina Azevedo Machado¹, Paula Maria Quaglio Bellozi², Andreza Fabro de Bem^{2/3}, Sonia Nair Bão⁴, Marcelo Alves da Silva Mori⁵,
Kelly Grace Magalhaes^{1*}

Referências Bibliográficas

- Aggio, J. B., Porto, B. N., Duarte dos Santos, C. N., Mosimann, A. L. P., & Wowk, P. F. (2022). Human Neutrophils Present Mild Activation by Zika Virus But Reduce the Infection of Susceptible Cells. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.784443>
- AL-Ayadhi, L. Y., & Mostafa, G. A. (2012). Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 158. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-158>
- Alippe, Y., Wang, L., Coskun, R., Muraro, S. P., Zhao, F. R., Elam-Noll, M., White, J. M., Vota, D. M., Hauk, V. C., Gordon, J. I., Handley, S. A., & Diamond, M. S. (2024). Fetal MAVS and type I IFN signaling pathways control ZIKV infection in the placenta and maternal decidua. *The Journal of Experimental Medicine*, 221(9). <https://doi.org/10.1084/jem.20240694>
- Arnold, M. L., & Saijo, K. (2021). Estrogen Receptor β as a Candidate Regulator of Sex Differences in the Maternal Immune Activation Model of ASD. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.717411>
- Arnold, S. J., & Robertson, E. J. (2009). Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 91–103. <https://doi.org/10.1038/nrm2618>
- Atladóttir, H. Ó., Thorsen, P., Østergaard, L., Schendel, D. E., Lemcke, S., Abdallah, M., & Parner, E. T. (2010). Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 40(12), 1423–1430. <https://doi.org/10.1007/s10803-010-1006-y>
- Azevedo, R. S. S., De Sousa, J. R., Araujo, M. T. F., Martins Filho, A. J., De Alcantara, B. N., Araujo, F. M. C., Queiroz, M. G. L., Cruz, A. C. R., Vasconcelos, B. H. B., Chiang, J. O., Martins, L. C., Casseb, L. M. N., Da Silva, E. V., Carvalho, V. L., Vasconcelos, B. C. B., Rodrigues, S. G., Oliveira, C. S., Quaresma, J. A. S., & Vasconcelos, P. F. C. (2018). In situ immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17765-5>
- Barbi, L., Victor, A., Coelho, C., Cláudio, L., Alencar, A. De, & Crovella, S. (2018). Review article Prevalence of Guillain-Barré syndrome among Zika virus infected cases : a systematic review and meta-analysis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 22(2), 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.02.005>
- Bayer, A., Lennemann, N. J., Ouyang, Y., Bramley, J. C., Morosky, S., Marques, E. T. D. A., Cherry, S., Sadovsky, Y., & Coyne, C. B. (2016). Type III Interferons Produced by

- Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host and Microbe*, 19(5), 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.008>
- Beaver, J. T., Lelutiu, N., Habib, R., & Skountzou, I. (2018). *Evolution of Two Major Zika Virus Lineages : Implications for Pathology , Immune Response , and Vaccine Development*. 9(July). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01640>
- Benazzato, C., Lojudice, F., Pöhlchen, F., Leite, P. E. C., Manucci, A. C., Van der Linden, V., Jungmann, P., Sogayar, M. C., Bruni-Cardoso, A., Russo, F. B., & Beltrão-Braga, P. (2024). Zika virus vertical transmission induces neuroinflammation and synapse impairment in brain cells derived from children born with Congenital Zika Syndrome. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65392-8>
- Ben-Yehuda, H., Matcovitch-Natan, O., Kertser, A., Spinrad, A., Prinz, M., Amit, I., & Schwartz, M. (2020). Maternal Type-I interferon signaling adversely affects the microglia and the behavior of the offspring accompanied by increased sensitivity to stress. *Molecular Psychiatry*, 25(5), 1050–1067. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0604-0>
- Berclaz, G., Altermatt, H. J., Rohrbach, V., Kieffer, I., Dreher, E., & Andres, A.-C. (2001). Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast. In *Annals of Oncology* (Vol. 12).
- Bernier, L. P., York, E. M., & MacVicar, B. A. (2020). Immunometabolism in the Brain: How Metabolism Shapes Microglial Function. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 43, Issue 11, pp. 854–869). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.08.008>
- Björkström, N. K., Strunz, B., & Ljunggren, H. G. (2022). Natural killer cells in antiviral immunity. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 112–123). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00558-3>
- Brasil, P., Pereira, J. P., Moreira, M. E., Ribeiro Nogueira, R. M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R. S., Valderramos, S. G., Halai, U.-A., Salles, T. S., Zin, A. A., Horovitz, D., Daltro, P., Boechat, M., Raja Gabaglia, C., Carvalho de Sequeira, P., Pilotto, J. H., Medialdea-Carrera, R., Cotrim da Cunha, D., ... Nielsen-Saines, K. (2016). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2321–2334. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1602412>
- Braz-De-Melo, H. A., Pasquarelli-do-Nascimento, G., Corrêa, R., das Neves Almeida, R., de Oliveira Santos, I., Prado, P. S., Picolo, V., de Bem, A. F., Pizato, N., & Magalhães, K. G. (2019). Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56556-y>
- Brown, A. S., Begg, M. D., Gravenstein, S., Schaefer, C. A., Wyatt, R. J., Bresnahan, M., Babulas, V. P., & Susser, E. S. (2004). Serologic Evidence of Prenatal Influenza in the

- Etiology of Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 61(8), 774–780.
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.8.774>
- Brown, A. S., Cohen, P., Harkavy-Friedman, J., Babulas, V., Malaspina, D., Gorman, J. M., & Susser, E. S. (2001). Prenatal rubella, premorbid abnormalities, and adult schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 49(6), 473–486. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01068-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01068-X)
- Bukovsky, A., Caudle, M. R., Cekanova, M., Fernando, R. I., Wimalasena, J., Foster, J. S., Henley, D. C., & Elder, R. F. (2003). Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant-comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells. In *Reproductive Biology and Endocrinology* (Vol. 1).
<http://www.RBEj.com/content/1/1/36>
- Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., Araujo, E. S. M., de Sequeira, P. C., de Mendonça, M. C. L., de Oliveira, L., Tschoeke, D. A., Schrago, C. G., Thompson, F. L., Brasil, P., dos Santos, F. B., Nogueira, R. M. R., Tanuri, A., & de Filippis, A. M. B. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(6), 653–660. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)
- Carteaux, G., Maquart, M., Bedet, A., Contou, D., Brugières, P., Fourati, S., Cleret de Langavant, L., de Broucker, T., Brun-Buisson, C., Leparac-Goffart, I., & Mekontso Dessap, A. (2016). Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *New England Journal of Medicine*, 374(16), 1595–1596. <https://doi.org/10.1056/nejmc1602964>
- Caruso, A., Ricceri, L., & Scattoni, M. L. (2020). Ultrasonic vocalizations as a fundamental tool for early and adult behavioral phenotyping of Autism Spectrum Disorder rodent models. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 116, pp. 31–43). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.06.011>
- Casazza, R. L., Philip, D. T., & Lazear, H. M. (2022). Interferon Lambda Signals in Maternal Tissues to Exert Protective and Pathogenic Effects in a Gestational Stage-Dependent Manner. *MBio*, 13(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.03857-21>
- CDC. (2019). *Zika vírus: microcefalia e outros defeitos congênitos*. Centers for Disease Control and Prevention. https://portugues.cdc.gov/zika/healtheffects/birth_defects.html
- Chalmers, S., Saunter, C., Wilson, C., Coats, P., Girkin, J. M., & McCarron, J. G. (2012). Mitochondrial Motility and Vascular Smooth Muscle Proliferation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(12), 3000–3011.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.255174>
- Chen, Q., Gouilly, J., Ferrat, Y. J., Espino, A., Glaziou, Q., Cartron, G., El Costa, H., Al-Daccak, R., & Jabrane-Ferrat, N. (2020a). Metabolic reprogramming by Zika virus

- provokes inflammation in human placenta. *Nature Communications*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16754-z>
- Chen, Q., Gouilly, J., Ferrat, Y. J., Espino, A., Glaziou, Q., Cartron, G., El Costa, H., Al-Daccak, R., & Jabrane-Ferrat, N. (2020b). Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta. *Nature Communications*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16754-z>
- Chen, Z., Zhong, D., & Li, G. (2019). The role of microglia in viral encephalitis: a review. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1443-2>
- Chess, S. (1971). Autism in children with congenital rubella. *Journal of Autism and Childhood Schizophrenia*, 1(1), 33–47. <https://doi.org/10.1007/BF01537741>
- Choi, G. B., Yim, Y. S., Wong, H., Kim, S., Kim, H., Kim, S. V., Hoeffler, C. A., Littman, D. R., & Huh, J. R. (2016). The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*, 351(6276), 933–939.
<https://doi.org/10.1126/science.aad0314>
- Codo, A. C., Davanzo, G. G., Monteiro, L. de B., de Souza, G. F., Muraro, S. P., Virgilio-da-Silva, J. V., Prodonoff, J. S., Carregari, V. C., de Biagi Junior, C. A. O., Crunfli, F., Jimenez Restrepo, J. L., Vendramini, P. H., Reis-de-Oliveira, G., Bispo dos Santos, K., Toledo-Teixeira, D. A., Parise, P. L., Martini, M. C., Marques, R. E., Carmo, H. R., ... Moraes-Vieira, P. M. (2020). Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metabolism*, 32(3), 437-446.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.007>
- Corrêa, R. (2020). *Modulação do perfil proteômico cerebral e da microbiota intestinal em camundongos imunocompetentes infectados pelo Zika vírus*. University of Brasilia.
- Corrêa, R., de Oliveira Santos, I., Braz-de-Melo, H. A., de Sant’Ana, L. P., das Neves Almeida, R., Pasquarelli-do-Nascimento, G., Prado, P. S., Kobinger, G. P., Maurice, C. F., & Magalhães, K. G. (2021). Gut microbiota modulation induced by Zika virus infection in immunocompetent mice. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-80893-y>
- Coyne, C. B., & Lazear, H. M. (2016). Zika virus-reigniting the TORCH. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 14, Issue 11, pp. 707–715). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.125>
- Da Saúde, M. (2023). *Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2023 Boletim Epidemiológico SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE MINISTÉRIO DA SAÚDE INTRODUÇÃO* (Vol. 54).

- Dahlgren, J., Samuelsson, A. M., Jansson, T., & Holmång, A. (2006). Interleukin-6 in the maternal circulation reaches the rat fetus in mid-gestation. *Pediatric Research*, 60(2), 147–151. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000230026.74139.18>
- Darmuzey, M., Touret, F., Slowikowski, E., Gladwyn-Ng, I., Ahuja, K., Sanchez-Felipe, L., de Lamballerie, X., Verfaillie, C., Marques, P. E., Neyts, J., & Kaptein, S. J. F. (2024). Epidemic Zika virus strains from the Asian lineage induce an attenuated fetal brain pathogenicity. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-55155-4>
- Davis, R. L., Buck, D. J., McCracken, K., Cox, G. W., & Das, S. (2018). Interleukin-1 β -induced inflammatory signaling in C20 human microglial cells. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 2018. <https://doi.org/10.20517/2347-8659.2018.60>
- De Barros Miranda-Filho, D., Martelli, C. M. T., De Alencar Ximenes, R. A., Araújo, T. V. B., Rocha, M. A. W., Ramos, R. C. F., Dhalia, R., De Oliveira Franca, R. F., De Azevedo Marques Junior, E. T., & Rodrigues, L. C. (2016). Initial description of the presumed congenital Zika syndrome. *American Journal of Public Health*, 106(4), 598–600. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2016.303115>
- de Oliveira, W. K., de França, G. V. A., Carmo, E. H., Duncan, B. B., de Souza Kuchenbecker, R., & Schmidt, M. I. (2017). Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. *The Lancet*, 390(10097), 861–870. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31368-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31368-5)
- Doshi-Velez, F., Avillach, P., Palmer, N., Bousvaros, A., Ge, Y., Fox, K., Steinberg, G., Spettell, C., Juster, I., & Kohane, I. (2015). Prevalence of Inflammatory Bowel Disease Among Patients with Autism Spectrum Disorders. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(10), 2281–2288. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000502>
- Duncan, C. J. A., & Hambleton, S. (2021). Human Disease Phenotypes Associated with Loss and Gain of Function Mutations in STAT2: Viral Susceptibility and Type I Interferonopathy. In *Journal of Clinical Immunology* (Vol. 41, Issue 7, pp. 1446–1456). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01118-z>
- Edlow, A. G., Castro, V. M., Shook, L. L., Haneuse, S., Kaimal, A. J., & Perlis, R. H. (2023). Sex-Specific Neurodevelopmental Outcomes among Offspring of Mothers with SARS-CoV-2 Infection during Pregnancy. *JAMA Network Open*, 6(3), E234415. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.4415>
- Elmore, S. A., Cochran, R. Z., Bolon, B., Lubeck, B., Mahler, B., Sabio, D., & Ward, J. M. (2022). Histology Atlas of the Developing Mouse Placenta. *Toxicologic Pathology*, 50(1), 60–117. <https://doi.org/10.1177/01926233211042270>
- Enninga, E. A. L., Raber, P., Quinton, R. A., Ruano, R., Ikumi, N., Gray, C. M., Johnson, E. L., Chakraborty, R., & Kerr, S. E. (2020). Maternal T Cells in the Human Placental Villi

- Support an Allograft Response during Noninfectious Villitis. *The Journal of Immunology*, 204(11), 2931–2939. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901297>
- Feng, Y. (2024). Recent advances in the study of zika virus structure, drug targets, and inhibitors. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1418516>
- Fialho, E. M. S., Veras, E. M., de Jesus, C. M., Khouri, R., Sousa, P. S., Ribeiro, M. R. C., Costa, L. C., Gomes, L. N., Nascimento, F. R. F., Silva, A. A. M., & Soeiro-Pereira, P. V. (2023). Maternal Immune Response to ZIKV Triggers High-Inflammatory Profile in Congenital Zika Syndrome. *Viruses*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/v15010220>
- Fialho, E. M. S., Veras, E. M., Jesus, C. M. de, Gomes, L. N., Khouri, R., Sousa, P. S., Ribeiro, M. R. C., Batista, R. F. L., Costa, L. C., Nascimento, F. R. F., Silva, A. A. M., & Soeiro-Pereira, P. V. (2023). Maternal Th17 Profile after Zika Virus Infection Is Involved in Congenital Zika Syndrome Development in Children. *Viruses*, 15(6). <https://doi.org/10.3390/v15061320>
- Filipp, F. V., Ratnikov, B., De Ingeniis, J., Smith, J. W., Osterman, A. L., & Scott, D. A. (2012). Glutamine-fueled mitochondrial metabolism is decoupled from glycolysis in melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 25(6), 732–739. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pcmr.12000>
- Ghosh, S., Castillo, E., Frias, E. S., & Swanson, R. A. (2018). Bioenergetic regulation of microglia. *Glia*, 66(6), 1200–1212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/glia.23271>
- Gorman, M. J., Caine, E. A., Zaitsev, K., Begley, M. C., Weger-Lucarelli, J., Uccellini, M. B., Tripathi, S., Morrison, J., Yount, B. L., Dinnon, K. H., Rückert, C., Young, M. C., Zhu, Z., Robertson, S. J., McNally, K. L., Ye, J., Cao, B., Mysorekar, I. U., Ebel, G. D., ... Diamond, M. S. (2018). An Immunocompetent Mouse Model of Zika Virus Infection. *Cell Host and Microbe*, 23(5), 672–685.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.04.003>
- Graciano, N. B., Gomes, I. M., De Castro, I. B., Vieira, J. G., Barbosa, G. N., De Moraes, A. S., Moura, C. B., Dos Santos, Y. F., Trindade, P. V. C., Iara, A., Ferreira, C., Sequeira, B. J., Ribeiro, L. B., & Nakashima, F. (2020). Casos de Síndrome de Gullain-Barré associados à infecção pelo Zika vírus no Brasil: uma revisão sistemática Gullain-Barré Syndrome cases associated with Zika virus infection in Brazil: a systematic review. *Health and Diversity*, 1–5. <http://www.mapa.turismo.gov.br/>
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., Schwarz, M. C., Sánchez-Seco, M. P., Evans, M. J., Best, S. M., & García-Sastre, A. (2016). Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host and Microbe*, 19(6), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.009>
- Gunasegaran, B., Krishnamurthy, S., Chow, S. S., Villanueva, M. D., Guller, A., Ahn, S. B., & Heng, B. (2025). Comparative Analysis of HMC3 and C20 Microglial Cell Lines

- Reveals Differential Myeloid Characteristics and Responses to Immune Stimuli. *Immunology*. <https://doi.org/10.1111/imm.13900>
- Guzeloglu-Kayisli, O., Guo, X., Tang, Z., Semerci, N., Ozmen, A., Larsen, K., Mutluay, D., Guller, S., Schatz, F., Kayisli, U. A., & Lockwood, C. J. (2020). Zika Virus–Infected Decidual Cells Elicit a Gestational Age–Dependent Innate Immune Response and Exaggerate Trophoblast Zika Permissiveness: Implication for Vertical Transmission. *The Journal of Immunology*, 205(11), 3083–3094. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000713>
- Hemberger, M., Hanna, C. W., & Dean, W. (2020). Mechanisms of early placental development in mouse and humans. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 21, Issue 1, pp. 27–43). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0169-4>
- Hodyl, N. A., Aboustate, N., Bianco-Miotto, T., Roberts, C. T., Clifton, V. L., & Stark, M. J. (2017). Child neurodevelopmental outcomes following preterm and term birth: What can the placenta tell us? In *Placenta* (Vol. 57, pp. 79–86). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.06.009>
- Holland, R., McIntosh, A. L., Finucane, O. M., Mela, V., Rubio-Araiz, A., Timmons, G., McCarthy, S. A., Gun'ko, Y. K., & Lynch, M. A. (2018). Inflammatory microglia are glycolytic and iron retentive and typify the microglia in APP/PS1 mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 68, 183–196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.017>
- Hoo, R., Nakimuli, A., & Vento-Tormo, R. (2020). Innate Immune Mechanisms to Protect Against Infection at the Human Decidual-Placental Interface. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02070>
- Horn, A., Raavicharla, S., Shah, S., Cox, D., & Jaiswal, J. K. (2020). Mitochondrial fragmentation enables localized signaling required for cell repair. *Journal of Cell Biology*, 219(5). <https://doi.org/10.1083/jcb.201909154>
- Hu, M., Bogoyevitch, M. A., & Jans, D. A. (2019). Subversion of host cell mitochondria by RSV to favor virus production is dependent on inhibition of mitochondrial complex I and ROS generation. *Cells*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/cells8111417>
- Hu, Y., Mai, W., Chen, L., Cao, K., Zhang, B., Zhang, Z., Liu, Y., Lou, H., Duan, S., & Gao, Z. (2020). mTOR-mediated metabolic reprogramming shapes distinct microglia functions in response to lipopolysaccharide and ATP. *Glia*, 68(5), 1031–1045. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/glia.23760>
- Huh, J. R., & Veiga-Fernandes, H. (2020). Neuroimmune circuits in inter-organ communication. *Nature Reviews Immunology*, 20(4), 217–228. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0247-z>
- Jabłońska, A., Studzińska, M., Suski, P., Kalinka, J., & Paradowska, E. (2018). Enhanced expression of IFI16 and RIG-I in human third-trimester placentas following HSV-1

- infection. *Clinical and Experimental Immunology*, 193(2), 255–263.
<https://doi.org/10.1111/cei.13143>
- Jaenisch, T., Rosenberger, K. D., Brito, C., Brady, O., Brasil, P., & Marques, E. T. (2017). Risk of microcephaly after Zika virus infection in Brazil, 2015 to 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, 95(3), 191–198. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.178608>
- Jagger, B. W., Miner, J. J., Cao, B., Arora, N., Smith, A. M., Kovacs, A., Mysorekar, I. U., Coyne, C. B., & Diamond, M. S. (2017). Gestational Stage and IFN- λ Signaling Regulate ZIKV Infection In Utero. *Cell Host and Microbe*, 22(3), 366–376.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.08.012>
- Jang, W. E., Park, J. H., Park, G., Bang, G., Na, C. H., Kim, J. Y., Kim, K. Y., Kim, K. P., Shin, C. Y., An, J. Y., Lee, Y. S., & Kim, M. S. (2023). Cntnap2-dependent molecular networks in autism spectrum disorder revealed through an integrative multi-omics analysis. *Molecular Psychiatry*, 28(2), 810–821. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01822-1>
- Jung, E. S., Choi, H., & Mook-Jung, I. (2025). Decoding microglial immunometabolism: a new frontier in Alzheimer's disease research. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13024-025-00825-0>
- Kaarbø, M., Ager-Wick, E., Osenbroch, P. Ø., Kilander, A., Skinnes, R., Müller, F., & Eide, L. (2011). Human cytomegalovirus infection increases mitochondrial biogenesis. *Mitochondrion*, 11(6), 935–945. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.08.008>
- Kalish, B. T., Kim, E., Finander, B., Duffy, E. E., Kim, H., Gilman, C. K., Yim, Y. S., Tong, L., Kaufman, R. J., Griffith, E. C., Choi, G. B., Greenberg, M. E., & Huh, J. R. (2021). Maternal immune activation in mice disrupts proteostasis in the fetal brain. *Nature Neuroscience*, 24(2), 204–213. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00762-9>
- Karniely, S., Weekes, M. P., Antrobus, R., Rorbach, J., Van Haute, L., Umrانيا, Y., Smith, D. L., Stanton, R. J., Minczuk, M., Lehner, P. J., & Sinclair, J. H. (2016). Human cytomegalovirus infection upregulates the mitochondrial transcription and translation machineries. *MBio*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00029-16>
- Kim, E., Huh, J. R., & Choi, G. B. (2024). Prenatal and postnatal neuroimmune interactions in neurodevelopmental disorders. In *Nature Immunology* (Vol. 25, Issue 4, pp. 598–606). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41590-024-01797-x>
- Kim, E., Lai, J., Sun, Y., Kim, M., Choi, G., Lee, A., & Huh, J. (2024). Homeostatic Type I IFN Response at the Placenta Contributes to Sex-biased Neurodevelopmental Outcome. http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/212/1_Supplement/1207_4712/1665260/1207_4712.pdf
- Kim, E., Paik, D., Ramirez, R. N., Biggs, D. G., Park, Y., Kwon, H. K., Choi, G. B., & Huh, J. R. (2022a). Maternal gut bacteria drive intestinal inflammation in offspring with

- neurodevelopmental disorders by altering the chromatin landscape of CD4⁺ T cells. *Immunity*, 55(1), 145-158.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.11.005>
- Kim, E., Paik, D., Ramirez, R. N., Biggs, D. G., Park, Y., Kwon, H. K., Choi, G. B., & Huh, J. R. (2022b). Maternal gut bacteria drive intestinal inflammation in offspring with neurodevelopmental disorders by altering the chromatin landscape of CD4⁺ T cells. *Immunity*, 55(1), 145-158.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.11.005>
- Kim, E., Tran, M., Sun, Y., & Huh, J. R. (2022). Isolation and analyses of lamina propria lymphocytes from mouse intestines. *STAR Protocols*, 3(2). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101366>
- Kim, H. (2023). Visualization of maternal IL-17a across the placental membrane. *Science Progress*, 106(3). <https://doi.org/10.1177/00368504231195500>
- Kim, N., Choi, H., Kim, U., Kim, S., Kim, Y. B., & Shin, H. Y. (2024). Sustained Microglial Activation Promotes Synaptic Loss and Neuronal Dysfunction after Recovery from ZIKV Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(17), 9451. <https://doi.org/10.3390/ijms25179451>
- Knuesel, I., Chicha, L., Britschgi, M., Schobel, S. A., Bodmer, M., Hellings, J. A., Toovey, S., & Prinssen, E. P. (2014). Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 10, Issue 11, pp. 643–660). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.187>
- Kousa, Y. A., & Hossain, R. A. (2021). Causes of phenotypic variability and disabilities after prenatal viral infections. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6020095>
- Kovacs, A. A. Z. (2020a). Zika, the newest TORCH infectious disease in the Americas. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 70, Issue 12, pp. 2673–2674). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz709>
- Kovacs, A. A. Z. (2020b). Zika, the newest TORCH infectious disease in the Americas. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 70, Issue 12, pp. 2673–2674). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz709>
- Kumar, A., Hou, S., Airo, A. M., Limonta, D., Mancinelli, V., Branton, W., Power, C., & Hobman, T. C. (2016a). Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Reports*, 17(12), 1766–1775. <https://doi.org/10.15252/embr.201642627>
- Kumar, A., Hou, S., Airo, A. M., Limonta, D., Mancinelli, V., Branton, W., Power, C., & Hobman, T. C. (2016b). Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Reports*, 17(12), 1766–1775. <https://doi.org/10.15252/embr.201642627>

- Lan, Z., Lv, S., Ge, Z., Zhao, B., Li, L., & Li, C. (2024). Lactic acid regulates lipid droplet aggregation through a microglia-neuron axis in neuroinflammation. *Journal of Lipid Research*, 100629. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2024.100629>
- Ledur, P. F., Karmirian, K., Pedrosa, C. da S. G., Souza, L. R. Q., Assis-de-Lemos, G., Martins, T. M., Ferreira, J. de C. C. G., de Azevedo Reis, G. F., Silva, E. S., Silva, D., Salerno, J. A., Ornelas, I. M., Devalle, S., Madeiro da Costa, R. F., Goto-Silva, L., Higa, L. M., Melo, A., Tanuri, A., Chimelli, L., ... Rehen, S. K. (2020). Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57914-x>
- Lee, B. K., Magnusson, C., Gardner, R. M., Blomström, Å., Newschaffer, C. J., Burstyn, I., Karlsson, H., & Dalman, C. (2015). Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 44, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.09.001>
- Li, C., Zhang, G., Zhao, L., Ma, Z., & Chen, H. (2016). Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 14(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0769-9>
- Li, F., Wang, P.-R., Qu, L.-B., Yi, C.-H., Zhang, F.-C., Tang, X.-P., Zhang, L.-G., & Chen, L. (2017). AXL is not essential for Zika virus infection in the mouse brain. *Emerging Microbes & Infections*, 6(3), e16. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.10>
- Li, H., Saucedo-Cuevas, L., Regla-Nava, J. A., Chai, G., Sheets, N., Tang, W., Terskikh, A. V., Shresta, S., & Gleeson, J. G. (2016). Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell*, 19(5), 593–598. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.005>
- Li, J., Wang, Y., Deng, H., Li, S., & Qiu, H. J. (2023). Cellular metabolism hijacked by viruses for immunoevasion: potential antiviral targets. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1228811>
- Li, Q. H., Kim, K., & Shresta, S. (2023). Mouse models of Zika virus transplacental transmission. *Antiviral Research*, 210. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105500>
- Liu, J., Liu, Y., Panda, S., Liu, A., Lei, J., & Burd, I. (2021). Type 1 Cytotoxic T Cells Increase in Placenta after Intrauterine Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.718563>
- Liu, L., Huang, X., Xu, C., Chen, C., Zhao, W., Li, D., Li, L., Wang, L., & Du, M. (2020). Decidual CD8+T cells exhibit both residency and tolerance signatures modulated by decidual stromal cells. *Journal of Translational Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02371-3>

- Lum, F. M., Low, D. K. S., Fan, Y., Tan, J. J. L., Lee, B., Chan, J. K. Y., Rénia, L., Ginhoux, F., & Ng, L. F. P. (2017). Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. *Clinical Infectious Diseases*, 64(7), 914–920. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw878>
- Luplertlop, N., Suwanmanee, S., Muangkaew, W., & Ampawong, S. (2017). *The impact of Zika virus infection on human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line*. September, 207–214.
- Marschallinger, J., Iram, T., Zardeneta, M., Lee, S. E., Lehallier, B., Haney, M. S., Pluvinage, J. V., Mathur, V., Hahn, O., Morgens, D. W., Kim, J., Tevini, J., Felder, T. K., Wolinski, H., Bertozzi, C. R., Bassik, M. C., Aigner, L., & Wyss-Coray, T. (2020). Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nature Neuroscience*, 23(2), 194–208. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0566-1>
- McCarthy, M. M., & Wright, C. L. (2017). Convergence of Sex Differences and the Neuroimmune System in Autism Spectrum Disorder. In *Biological Psychiatry* (Vol. 81, Issue 5, pp. 402–410). Elsevier USA. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.10.004>
- Mécharles, S., Herrmann, C., Poullain, P., Tran, T.-H., Deschamps, N., Mathon, G., Landais, A., Breurec, S., & Lannuzel, A. (2016). Acute myelitis due to Zika virus infection. *The Lancet*, 387(10026), 1481. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00644-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00644-9)
- Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., Le Charpentier, T., Hafirassou, M. L., Zamborlini, A., Cao-Lormeau, V. M., Culpier, M., Missé, D., Jouvenet, N., Tabibiazar, R., Gressens, P., Schwartz, O., & Amara, A. (2017). Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Reports*, 18(2), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.045>
- Megli, C. J., & Coyne, C. B. (2022). Infections at the maternal–fetal interface: an overview of pathogenesis and defence. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 20, Issue 2, pp. 67–82). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00610-y>
- Metzler, A. D., & Tang, H. (2024). Zika Virus Neuropathogenesis—Research and Understanding. In *Pathogens* (Vol. 13, Issue 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/pathogens13070555>
- Michita, R. T., Tran, L. B., Bark, S. J., Kumar, D., Toner, S. A., Jose, J., Mysorekar, I. U., & Narayanan, A. (2025). Zika virus NS1 drives tunneling nanotube formation for mitochondrial transfer and stealth transmission in trophoblasts. *Nature Communications*, 16(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56927-2>
- Ministério da Saúde. (2025). *Informe Semanal COE SUS - Dengue e outras arboviroses*. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes->
- Mirabella, F., Desiato, G., Mancinelli, S., Fossati, G., Rasile, M., Morini, R., Markicevic, M., Grimm, C., Amegandjin, C., Termanini, A., Peano, C., Kunderfranco, P., di Cristo, G.,

- Zerbi, V., Menna, E., Lodato, S., Matteoli, M., & Pozzi, D. (2021). Prenatal interleukin 6 elevation increases glutamatergic synapse density and disrupts hippocampal connectivity in offspring. *Immunity*, 54(11), 2611-2631.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.10.006>
- Mitsi, V., Ruiz, A., Polizu, C., Farzinpour, Z., Ramakrishnan, A., Serafini, R. A., Parise, E. M., Floodstrand, M., Sial, O. K., Gaspari, S., Tang, C. Y., Nestler, E. J., Schmidt, E. F., Shen, L., & Zachariou, V. (2024). RGS4 Actions in Mouse Prefrontal Cortex Modulate Behavioral and Transcriptomic Responses to Chronic Stress and Ketamine. *Molecular Pharmacology*, 105(4), 272–285. <https://doi.org/10.1124/molpharm.123.000753>
- Nagy, A. M., Fekete, R., Horvath, G., Koncsos, G., Kriston, C., Sebestyen, A., Giricz, Z., Kornyei, Z., Madarasz, E., & Tretter, L. (2018). Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1859(3), 201–214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2017.12.002>
- Nair, S., Sobotka, K. S., Joshi, P., Gressens, P., Fleiss, B., Thornton, C., Mallard, C., & Hagberg, H. (2019). Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response in vitro and in vivo. *Glia*, 67(6), 1047–1061. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/glia.23587>
- Nakajima, Y., Chamoto, K., Oura, T., & Honjo, T. (2021). Critical role of the CD44^{low}CD62L^{low} CD8⁺ T cell subset in restoring antitumor immunity in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(23). <https://doi.org/10.1073/pnas.2103730118>
- Narang, K., Cheek, E. H., Enninga, E. A. L., & Theiler, R. N. (2021). Placental immune responses to viruses: Molecular and histo-pathologic perspectives. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 6, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22062921>
- Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Lullo, E. Di, Kriegstein, A. R., Francisco, S., Francisco, S., Francisco, S., & Francisco, S. (2017). Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Human Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 18(5), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.012>.Expression
- Oh, D. S., Kim, E., Normand, R., Lu, G., Shook, L. L., Lyall, A., Jasset, O., Demidkin, S., Gilbert, E., Kim, J., Akinwunmi, B., Tantivit, J., Tirard, A., Arnold, B. Y., Slowikowski, K., Goldberg, M. B., Filbin, M. R., Hacohen, N., Nguyen, L. H., ... Huh, J. R. (2024). SARS-CoV-2 infection elucidates features of pregnancy-specific immunity. *Cell Reports*, 43(11), 114933. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114933>
- O’Keeffe, G. W., & Kenny, L. C. (2014). Predicting infant neurodevelopmental outcomes using the placenta? In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 20, Issue 6, pp. 303–305). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.04.005>

- Oliveira, F. B. C. de, Freire, V. P. A. S. de S., Coelho, S. V. A., Meuren, L. M., Palmeira, J. da F., Cardoso, A. L., Neves, F. de A. R., Ribeiro, B. M., Argañaraz, G. A., Arruda, L. B. de, & Argañaraz, E. R. (2023). ZIKV Strains Elicit Different Inflammatory and Anti-Viral Responses in Microglia Cells. *Viruses*, 15(6). <https://doi.org/10.3390/v15061250>
- Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British Journal of Pharmacology*, 173(4), 649–665. <https://doi.org/10.1111/bph.13139>
- Paiva, I. A., Familiar-Macedo, D., Badolato-Corrêa, J., Carvalho, F. R., Dias, H. G., Pauvolid-Corrêa, A., Dos Santos, C. F., Silva, A. A., de Azeredo, E. L., de Oliveira Vianna, R. A., Cardoso, C. A. A., Grifoni, A., Sette, A., Weiskopf, D., & De-Oliveira-pinto, L. M. (2022). Involvement of Th1Th17 Cell Subpopulations in the Immune Responses of Mothers Who Gave Birth to Children with Congenital Zika Syndrome (CZS). *Viruses*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/v14020250>
- Paixão, E. S., Fernandes, Q. H. R. F., Cardim, L. L., Pescarini, J. M., Costa, M. C. N., Falcão, I. R., Brickley, E. B., Santos, A. C., Portela Souza, A., Carvalho-Sauer, R. D. C. O., Smeeth, L., Rodrigues, L. C., Barreto, M. L., & Teixeira, M. G. (2022). Socioeconomic risk markers of congenital Zika syndrome: a nationwide, registry-based study in Brazil. *BMJ Global Health*, 7(9). <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2022-009600>
- Palmer, C. S. (2022). Innate metabolic responses against viral infections. In *Nature Metabolism* (Vol. 4, Issue 10, pp. 1245–1259). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00652-3>
- Pang, S. C., Janzen-Pang, J., Tse, M. Y., Croy, B. A., & Lima, P. D. A. (2014). The Cycling and Pregnant Mouse: Gross Anatomy. In *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy* (pp. 3–19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394445-0.00001-1>
- Panja, S., & Paria, B. C. (2021). Development of the Mouse Placenta. In *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology* (Vol. 234, pp. 205–221). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/978-3-030-77360-1_10
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brône, B., Brown, G. C., Butovsky, O., Carson, M. J., Castellano, B., Colonna, M., & Cowley, S. A. (n.d.). *Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads* (Vol. 34).
- Park, C., Lecomte, M.-J., & Schindler, C. (1999). Murine Stat2 is uncharacteristically divergent. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 27, Issue 21).
- Parker, E. L., Silverstein, R. B., Verma, S., & Mysorekar, I. U. (2020). Viral-Immune Cell Interactions at the Maternal-Fetal Interface in Human Pregnancy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.522047>

- Phimister, E. G., Mysorekar, I. U., & Diamond, M. S. (2016). *Modeling Zika Virus Infection in Pregnancy*.
- Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 5, Issue 5, pp. 375–386).
<https://doi.org/10.1038/nri1604>
- Postler, T. S., Beer, M., Blitvich, B. J., Bukh, J., de Lamballerie, X., Drexler, J. F., Imrie, A., Kapoor, A., Karganova, G. G., Lemey, P., Lohmann, V., Simmonds, P., Smith, D. B., Stapleton, J. T., & Kuhn, J. H. (2023). Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family *Flaviviridae*. In *Archives of Virology* (Vol. 168, Issue 9). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>
- PrabhuDas, M., Bonney, E., Caron, K., Dey, S., Erlebacher, A., Fazleabas, A., Fisher, S., Golos, T., Matzuk, M., McCune, J. M., Mor, G., Schulz, L., Soares, M., Spencer, T., Strominger, J., Way, S. S., & Yoshinaga, K. (2015). Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nature Immunology*, 16(4), 328–334. <https://doi.org/10.1038/ni.3131>
- Quicke, K. M., Bowen, J. R., Johnson, E. L., McDonald, C. E., Ma, H., O’Neal, J. T., Rajakumar, A., Wrammert, J., Rimawi, B. H., Pulendran, B., Schinazi, R. F., Chakraborty, R., & Suthar, M. S. (2016). Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host and Microbe*, 20(1), 83–90.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.015>
- Rackaityte, E., & Halkias, J. (2020). Mechanisms of Fetal T Cell Tolerance and Immune Regulation. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00588>
- Rock, R. B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W. S., Cheeran, M., Lokensgard, J. R., & Peterson, P. K. (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 942–964. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.942-964.2004>
- Rosito, M., Sanchini, C., Gosti, G., Moreno, M., De Panfilis, S., Giubettini, M., Debellis, D., Catalano, F., Peruzzi, G., Marotta, R., Indrieri, A., De Leonibus, E., De Stefano, M. E., Ragozzino, D., Ruocco, G., Di Angelantonio, S., & Bartolini, F. (2023). Microglia reactivity entails microtubule remodeling from acentrosomal to centrosomal arrays. *Cell Reports*, 42(2). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112104>
- Rousset, C. I., Chalon, S., Cantagrel, S., Bodard, S., Andres, C., Gressens, P., & Saliba, E. (2006). Maternal Exposure to LPS Induces Hypomyelination in the Internal Capsule and Programmed Cell Death in the Deep Gray Matter in Newborn Rats. *Pediatric Research*, 59(3), 428–433. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000199905.08848.55>

- Rousset, C. I., Kassem, J., Olivier, P., Chalon, S., Gressens, P., & Saliba, E. (2008). Antenatal Bacterial Endotoxin Sensitizes the Immature Rat Brain to Postnatal Excitotoxic Injury. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(10), 994–1000. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31818894a1>
- Rudolph, M. D., Graham, A. M., Feczko, E., Miranda-Dominguez, O., Rasmussen, J. M., Nardos, R., Entringer, S., Wadhwa, P. D., Buss, C., & Fair, D. A. (2018a). Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. *Nature Neuroscience*, 21(5), 765–772. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0128-y>
- Rudolph, M. D., Graham, A. M., Feczko, E., Miranda-Dominguez, O., Rasmussen, J. M., Nardos, R., Entringer, S., Wadhwa, P. D., Buss, C., & Fair, D. A. (2018b). Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. *Nature Neuroscience*, 21(5), 765–772. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0128-y>
- Ryan, S. J., Carlson, C. J., Tesla, B., Bonds, M. H., Ngonghala, C. N., Mordecai, E. A., Johnson, L. R., & Murdock, C. C. (2021). Warming temperatures could expose more than 1.3 billion new people to Zika virus risk by 2050. *Global Change Biology*, 27(1), 84–93. <https://doi.org/10.1111/gcb.15384>
- Samuelsson, A.-M., Jennische, E., Hansson, H.-A., Holmäng, A., & Samuelsson, A.-M. (2006). Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA A dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290, 1345–1356. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00268.2005>.-During
- Sánchez-García, F. J., Pérez-Hernández, C. A., Rodríguez-Murillo, M., & Moreno-Altamirano, M. M. B. (2021). The Role of Tricarboxylic Acid Cycle Metabolites in Viral Infections. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.725043>
- Sarieva, K., Kagermeier, T., Khakipoor, S., Atay, E., Yentür, Z., Becker, K., & Mayer, S. (2023). Human brain organoid model of maternal immune activation identifies radial glia cells as selectively vulnerable. *Molecular Psychiatry*, 28(12), 5077–5089. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-01997-1>
- Schepanski, S., Buss, C., Hanganu-Opatz, I. L., & Arck, P. C. (2018). Prenatal Immune and Endocrine Modulators of Offspring's Brain Development and Cognitive Functions Later in Life. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02186>
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 32, pp. 513–545). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>

- Seta, Y., Kawakatsu, K., Degawa, S., Goto, T., & Nishikata, T. (2023). Morphological Evidence for Novel Roles of Microtubules in Macrophage Phagocytosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/ijms24021373>
- Shin Yim, Y., Park, A., Berrios, J., Lafourcade, M., Pascual, L. M., Soares, N., Yeon Kim, J., Kim, S., Kim, H., Waisman, A., Littman, D. R., Wickersham, I. R., Harnett, M. T., Huh, J. R., & Choi, G. B. (2017). Reversing behavioural abnormalities in mice exposed to maternal inflammation. *Nature*, 549(7673), 482–487. <https://doi.org/10.1038/nature23909>
- Silva-Filho, J. L., de Oliveira, L. G., Monteiro, L., Parise, P. L., Zanluqui, N. G., Polonio, C. M., de Freitas, C. L., Toledo-Teixeira, D. A., de Souza, W. M., Bittencourt, N., Amorim, M. R., Forato, J., Muraro, S. P., de Souza, G. F., Martini, M. C., Bispo-dos-Santos, K., Vieira, A., Judice, C. C., Pastore, G. M., ... Proença-Modena, J. L. (2021). Gas6 drives Zika virus-induced neurological complications in humans and congenital syndrome in immunocompetent mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 97, 260–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.08.008>
- Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *Journal of Infectious Diseases*, 216(Suppl 10), S935–S944. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix515>
- Smith, S. E. P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., & Patterson, P. H. (2007). Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *Journal of Neuroscience*, 27(40), 10695–10702. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007>
- Socodato, R., & Relvas, J. B. (2024). A cytoskeleton symphony: Actin and microtubules in microglia dynamics and aging. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 234). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2024.102586>
- Souza, B. S. F., Sampaio, G. L. A., Pereira, C. S., Campos, G. S., Sardi, S. I., Freitas, L. A. R., Figueira, C. P., Paredes, B. D., Nonaka, C. K. V., Azevedo, C. M., Rocha, V. P. C., Bandeira, A. C., Mendez-Otero, R., Dos Santos, R. R., & Soares, M. B. P. (2016). Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Scientific Reports*, 6(September), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep39775>
- Stefanik, M., Formanova, P., Bily, T., Vancova, M., Eyer, L., Palus, M., Salat, J., Braconi, C. T., Zanutto, P. M. de A., Gould, E. A., & Ruzek, D. (2018). Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. *BMC Neuroscience*, 19(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0407-2>
- Strange, D. P., Jiyarom, B., Pourhabibi Zarandi, N., Xie, X., Baker, C., Sadri-Ardekani, H., Shi, P.-Y., & Verma, S. (2019). Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. *MBio*, 10(4), 1–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01372-19>

- Strange, D. P., Jiyarom, B., Zarandi, N. P., Xie, X., Baker, C., Sadri-Ardekani, H., Shi, P.-Y., & Verma, S. (2019). Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral. *American Society for Microbiology*, 10(4), 1–16.
- Sumbria, D., Berber, E., Mathayan, M., & Rouse, B. T. (2021). Virus Infections and Host Metabolism—Can We Manage the Interactions? In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594963>
- Svensson-Arvelund, J., Mehta, R. B., Lindau, R., Mirrasekhian, E., Rodriguez-Martinez, H., Berg, G., Lash, G. E., Jenmalm, M. C., & Ernerudh, J. (2015). The Human Fetal Placenta Promotes Tolerance against the Semiallogeneic Fetus by Inducing Regulatory T Cells and Homeostatic M2 Macrophages. *The Journal of Immunology*, 194(4), 1534–1544. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401536>
- Tabata, T., Petitt, M., Puerta-Guardo, H., Michlmayr, D., Harris, E., & Pereira, L. (2018). Zika Virus Replicates in Proliferating Cells in Explants from First-Trimester Human Placentas, Potential Sites for Dissemination of Infection. *Journal of Infectious Diseases*, 217(8), 1202–1213. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix552>
- Tabata, T., Petitt, M., Puerta-Guardo, H., Michlmayr, D., Wang, C., Fang-Hoover, J., Harris, E., & Pereira, L. (2016). Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host and Microbe*, 20(2), 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.002>
- Tan, T. Y., Fibriansah, G., Kostyuchenko, V. A., Ng, T. S., Lim, X. X., Zhang, S., Lim, X. N., Wang, J., Shi, J., Morais, M. C., Corti, D., & Lok, S. M. (2020). Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9>
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S. C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., Shin, J., Zhang, F., Lee, E. M., Christian, K. M., Didier, R. A., Jin, P., Song, H., & Ming, G. L. (2016). Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell*, 18(5), 587–590. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>
- Tappe, D., Pérez-Girón, J. V., Zammarchi, L., Rissland, J., Ferreira, D. F., 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(3), 269–273. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0445-7>
- Tartaglione, A. M., Villani, A., Ajmone-Cat, M. A., Minghetti, L., Ricceri, L., Pazienza, V., De Simone, R., & Calamandrei, G. (2022). Maternal immune activation induces autism-like changes in behavior, neuroinflammatory profile and gut microbiota in mouse offspring of both sexes. *Translational Psychiatry*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-022-02149-9>

- Tripathi, M. K., Ojha, S. K., Kartawy, M., Khaliulin, I., Hamoudi, W., & Amal, H. (2024). Mutations associated with autism lead to similar synaptic and behavioral alterations in both sexes of male and female mouse brain. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50248-4>
- Verhaegen, M., & Vermeire, K. (2024). The endoplasmic reticulum (ER): a crucial cellular hub in flavivirus infection and potential target site for antiviral interventions. *Npj Viruses*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s44298-024-00031-7>
- Villazana-Kretzer, D. L., Wuertz, K. M. G., Newhouse, D., Damicis, J. R., Dornisch, E. M., Voss, K. M., Muruato, A. E., Paymaster, J. A., Schmiedecke, S. S., Edwards, S. M., Napolitano, P. G., Tisoncik-Go, J., Ieronimakis, N., & Gale, M. (2022). ZIKV can infect human term placentas in the absence of maternal factors. *Communications Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03158-6>
- Wachira, V. K., Nascimento, G. L., Peixoto, H. M., & de Oliveira, M. R. F. (2021). Burden of Disease of Guillain–Barré Syndrome in Brazil before and during the Zika virus epidemic 2014–2016. *Tropical Medicine and International Health*, 26(1), 66–81. <https://doi.org/10.1111/tmi.13508>
- Wang, L., Pavlou, S., Du, X., Bhuckory, M., Xu, H., & Chen, M. (2019). Glucose transporter 1 critically controls microglial activation through facilitating glycolysis. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0305-9>
- Wang, M., Liu, Y., Sun, R., Liu, F., Li, J., Yan, L., Zhang, J., Xie, X., Li, D., Wang, Y., Li, S., Zhu, X., Li, R., Lu, F., Xiao, Z., & Wang, H. (2024). Single-nucleus multi-omic profiling of human placental syncytiotrophoblasts identifies cellular trajectories during pregnancy. *Nature Genetics*, 56(2), 294–305. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01647-w>
- Wang, Y., Gu, Y., Lewis, D. F., Gu, X., Brown, K., Lachute, C., Hankins, M., Scott, R. S., Busada, C., Cooper, D. B., McCathran, C. E., & Barrilleaux, P. (2023). Cell-type specific distribution and activation of type I IFN pathway molecules at the placental maternal-fetal interface in response to COVID-19 infection. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.951388>
- Weaver, S. C., Costa, F., Garcia-Blanco, M. A., Ko, A. I., Ribeiro, G. S., Saade, G., Shi, P. Y., & Vasilakis, N. (2016). Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. In *Antiviral Research* (Vol. 130). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010>
- Weisblum, Y., Oiknine-Djian, E., Vorontsov, O. M., Haimov-Kochman, R., Zakay-Rones, Z., Meir, K., Shveiky, D., Elgavish, S., Nevo, Y., Roseman, M., Bronstein, M., Stockheim, D., From, I., Eisenberg, I., Lewkowicz, A. A., Yagel, S., Panet, A., & Wolf, D. G. (2017a). Zika Virus Infects Early- and Midgestation Human Maternal Decidual Tissues, Inducing Distinct Innate Tissue Responses in the Maternal-Fetal Interface. *Journal of Virology*, 91(4). <https://doi.org/10.1128/jvi.01905-16>

- Weisblum, Y., Oiknine-Djian, E., Vorontsov, O. M., Haimov-Kochman, R., Zakay-Rones, Z., Meir, K., Shveiky, D., Elgavish, S., Nevo, Y., Roseman, M., Bronstein, M., Stockheim, D., From, I., Eisenberg, I., Lewkowicz, A. A., Yagel, S., Panet, A., & Wolf, D. G. (2017b). Zika Virus Infects Early- and Midgestation Human Maternal Decidual Tissues, Inducing Distinct Innate Tissue Responses in the Maternal-Fetal Interface. *Journal of Virology*, 91(4). <https://doi.org/10.1128/jvi.01905-16>
- World Health Organization (WHO). (2017). *The History of Zika*. World Health Organisation. <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/history/en/>
- Wu, H., Huang, X. Y., Sun, M. X., Wang, Y., Zhou, H. Y., Tian, Y., He, B., Li, K., Li, D. Y., Wu, A. P., Wang, H., & Qin, C. F. (2023). Zika virus targets human trophoblast stem cells and prevents syncytialization in placental trophoblast organoids. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41158-0>
- Yu, J., Zheng, Y. M., Sheridan, M. A., Li, P., Ezashi, T., Roberts, R. M., & Liu, S. L. (2025). Autophagy-mediated downregulation of AXL and TIM-1 promotes sustained Zika virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 122(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.2427241122>
- Zanluqui, N., Oliveira, L., Polonio, C., França, T., De Souza, G., Muraro, S., Amorim, M., Carregari, V., Brandão-Teles, C., da Silva, P., de Oliveira, M., França, R., Cunha, M., Nogueira, M., Martins-de-Souza, D., Condino-Neto, A., Proença-Modena, J., & Peron, J. (2021). *Zika Virus Infection of Murine and Human Neutrophils and their Function as Trojan Horses to the Placenta*. <https://doi.org/10.1101/2021.09.14.460378>
- Zhang, L., Richard, A. S., Jackson, C. B., Ojha, A., & Choe, H. (2020). Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylserine Synergize To Enhance GAS6/AXL-Mediated Virus Infection and Efferocytosis. *Journal of Virology*, 95(2). <https://doi.org/10.1128/jvi.02079-20>
- Zhang, N., Zhang, N., Qin, C. F., Liu, X., Shi, L., & Xu, Z. (2016). Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell*, 19(1), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.017>
- Zhou, H., Zhao, C., Wang, P., Yang, W., Zhu, H., & Zhang, S. (2023). Regulators involved in trophoblast syncytialization in the placenta of intrauterine growth restriction. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1107182>
- Zhou, J., Chi, X., Cheng, M., Huang, X., Liu, X., Fan, J., Xu, H., Lin, T., Shi, L., Qin, C., & Yang, W. (2019). Zika virus degrades the ω -3 fatty acid transporter Mfsd2a in brain microvascular endothelial cells and impairs lipid homeostasis. *Science Advances*. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax714>

Zorrilla, C. D., García García, I., García Fragoso, L., & De La Vega, A. (2017). Zika Virus Infection in Pregnancy: Maternal, Fetal, and Neonatal Considerations. *Journal of Infectious Diseases*, 216, S891–S896. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix448>