



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Efeitos de diferentes estatinas sobre micróglia, neurônios e a resposta à infecção pelo vírus Zika

Gabriel Felipe Gomes Calixto

Brasília

2025



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Biologia - IB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Efeitos de diferentes estatinas sobre micróglia, neurônios e a
resposta à infecção pelo vírus Zika**

Gabriel Felipe Gomes Calixto

Dissertação de mestrado desenvolvida no
Programa de Pós-Graduação em Biologia
molecular da Universidade de Brasília.

Orientadora: **Kelly Grace Magalhães**

Brasília

2025

*De omnibus Dubitandum*¹

“Si un hombre nunca se contradice, será porque nunca dice nada”

Miguel de Unamuno

“O que incita a olhar todos [...] de um modo meio desconfiado, meio zombeteiro não é o fato de mais e mais se descobrir o quanto eles são inocentes- com que frequência e com que facilidade eles se enganam e se perdem, em poucas palavras, sua criancice e infantilidade-, mas o fato de que eles não procedem de modo honesto o bastante, ao mesmo tempo em que fazem em conjunto um grande e virtuoso alarido tão logo o problema da veracidade seja tocado ainda que de leve. Todos fazem de conta que descobriram e alcançaram suas autênticas opiniões através do desenvolvimento próprio de uma dialética fria, pura, divinamente despreocupada [...] enquanto, no fundo, defendem uma tese adotada antecipadamente, uma ideia repentina, uma ‘inspiração’, geralmente um anelo abstratizado e peneirado, com razões procuradas posteriormente: são, todos eles, advogados que não querem ser chamados por esse nome[...].”

Nietzsche

¹ Ponto de partida do princípio cartesiano.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho não seria possível se a dona Sinair e o seu Abmael não tivessem acreditado em seu filho e não tivessem feito tudo aquilo que estava na disposição deles para tornar o sonho deste possível. Portanto, a realização do presente trabalho é, antes de tudo, apenas minha obrigação em honrar os esforços em mim creditados. Todo meu amor a vocês, mãe e pai.

Agradeço a todos aqueles os quais me ajudaram ao longo dessa longa e eterna jornada na trilha do conhecimento. À minha irmã Letícia, por todos conselhos, ajudas e cuidados típicos de um imã mais velha, você é um exemplo para mim. Ao meu irmão de outra mãe, Luiz Braz, meu melhor amigo, por todo apoio, momentos de alegria e conversas sobre a vida. Momentos desta amizade são momentos de genuína felicidade para mim. À minha namorada, Juliana Carvalho, por aquela carona a São Sebastião, (após uma suposta ausência itinerária) que mudou minha vida dali em diante. Além disso, por me apoiar de todas as maneiras, por me aconselhar, por entender meus momentos de isolamento, mas também me ensinar que só se vive uma vez, por ser minha companheira, te amo. Sua benevolência e companheirismo sempre serão um exemplo e uma inspiração para mim. Ao Marcos Paulo, Jean Carlos, Rebeca Gomes que, por meio de ajudas materiais, confiaram em mim. Me inspiro na generosidade de vocês.

Agradeço a todos meus professores e tutores ao longo dessa jornada. Essa profissão sempre me inspirou e se não fosse pelo esforço de grandes professores (as) em um país que não valoriza a educação, eu jamais estaria aqui. Obrigado professores do C.E.M 01 de São Sebastião e da Universidade de Brasília (UnB).

Agradeço à professora Kelly Grace, pela oportunidade no LIMI e pela orientação ao longo desses quatro anos de laboratório. Sem dúvida foi um período de grande aprendizado para mim. Agradeço ao Ramon, com o qual converso desde o primeiro dia de graduação, e ao Felipe, que tive a honra de conviver o laboratório, por todas as ajudas e pela parceria. Espero que esse seja o início de duradouras amizades. Agradeço a todos os colegas de laboratório do LIMI: Heloísa, Gabriel Pasquareli, Igor, Sabrina, Milena, Julia, Fernanda, Clarissa, Nathália, Mickaella, Laís, Maria Heloísa, Isabela, Rafaela, Nicolas e Jäder. A esses dois últimos, também agradeço por todo auxílio e pelas perguntas,

que me instigavam a melhorar cientificamente. Agradeço ao Chiquinho, parte essencial para o funcionamento adequado dos laboratórios. Obrigado pelas conversas, pelos cafés e pelos materiais. Além disso, agradeço à Raquel Almeida por me guiar no início da minha jornada acadêmica. Seus ensinamentos me moldaram em minha jornada científica. Agradeço também aos meus colaboradores: Heloísa, Sarah, Ramon, Renato e Professores Thomas e Brígido. Obrigado por toda ajuda, esse trabalho não seria possível de outro modo. Por fim, agradeço às seguintes agências de fomento por tornarem essa pesquisa possível: CAPES, CNPq e FAPDF.

Resumo

Estatinas são um dos fármacos mais utilizados mundialmente por sua capacidade de reduzir a lipoproteína de baixa densidade (LDL), prevenindo e tratando doenças cardiovasculares. Embora seus benefícios superem os riscos na maioria dos casos, efeitos adversos são comuns, especialmente em estatinas lipofílicas. Esses efeitos incluem manifestações musculares, hepáticas, e também alterações no sistema nervoso central (SNC). A ausência de uma explicação satisfatória para os efeitos neurológicos ressalta a importância de investigações em modelos relevantes, como micróglia e neurônios, que têm papéis centrais no SNC. Adicionalmente, a capacidade das estatinas em reduzir a síntese de colesterol é não somente estudada na prevenção de doenças cardiovasculares, mas também em outros contextos patológicos. O metabolismo lipídico é fundamental em infecções causadas por vírus do gênero *Orthoflavivirus*, como o Zika (ZIKV), que frequentemente induzem um aumento na síntese e captação de colesterol. Paralelamente, a redução do colesterol tem demonstrado efeitos antivirais, enfatizando o papel dessa molécula na infecção. Sabendo que o cérebro é o órgão mais rico em colesterol e que o ZIKV apresenta tropismo neurológico, ilustrado por complicações congênitas em filhos de mães infectadas, questiona-se se o uso de estatinas poderia ser benéfico nessa infecção. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos de diferentes estatinas sobre micróglia e neurônios, bem como na resposta à infecção pelo ZIKV. Para isso, células microgлияis (C20) e neurônios foram tratados com estatinas lipofílicas ou hidrofílicas durante diferentes períodos, a fim de analisar citotoxicidade, inflamação e morte celular. Ademais, avaliamos o perfil metabólico e a modulação da via do mevalonato durante a infecção com o ZIKV em células microgлияis, além de tratar com estatinas essas células, antes e durante a infecção, para investigar a citotoxicidade, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a carga viral. Identificamos que as estatinas lipofílicas aumentam a citotoxicidade e a morte celular em comparação com a estatina hidrofílica, tanto em micróglia quanto em neurônios. Em micróglia, essa citotoxicidade foi independente de ROS em tempos iniciais e foi acompanhada de um fenótipo mais pró-inflamatório nas estatinas lipofílicas. Observamos um aumento dos produtos da via do mevalonato durante a infecção microgлияl pelo ZIKV, incluindo colesterol e isoprenoides. Além disso, o tratamento com rosuvastatina reduziu o estresse oxidativo em células infectadas e impediu a perda de viabilidade microgлияl induzida pelo ZIKV, sem alterar a carga viral. Esses achados fornecem *insights* valiosos para a

elucidação de possíveis mecanismos para efeitos adversos neurológicos associados ao uso de estatinas, bem como para a identificação de possíveis alvos para intervenções terapêuticas mais eficazes contra o ZIKV.

Palavras-chave: Estatinas, Colesterol, Micróglia, ZIKV, Efeitos adversos

Abstract

Statins are among the most widely used drugs worldwide due to their ability to reduce low-density lipoprotein (LDL), preventing and treating cardiovascular diseases. Although their benefits outweigh the risks in most cases, adverse effects are common, especially with lipophilic statins. These effects include muscular and hepatic manifestations, as well as alterations in the central nervous system (CNS). The lack of a satisfactory explanation for these neurological effects highlights the importance of investigations in relevant models, such as microglia and neurons, which play central roles in the CNS. Additionally, the ability of statins to reduce cholesterol synthesis is not only studied in the prevention of cardiovascular diseases but also in other pathological contexts. Lipid metabolism is crucial in infections caused by viruses of the *Orthoflavivirus* genus, such as Zika virus (ZIKV), which often induces an increase in cholesterol synthesis and uptake. At the same time, cholesterol reduction has demonstrated antiviral effects, emphasizing the role of this molecule in infection. Considering that the brain is the richest organ in cholesterol and that ZIKV exhibits neurological tropism—illustrated by congenital complications in children born to infected mothers—the potential benefits of statin use in this infection remain an open question. Thus, the present study aims to evaluate the effects of different statins on microglia and neurons, as well as their influence on the response to ZIKV infection. To achieve this, microglial cells (C20) and neurons were treated with lipophilic or hydrophilic statins for different periods to analyze cytotoxicity, inflammation, and cell death. Moreover, we assessed the metabolic profile and modulation of the mevalonate pathway during ZIKV infection in microglial cells. We also treated these cells with statins before and during the infection to investigate cytotoxicity, the generation of reactive

oxygen species (ROS), and viral load. We identified that lipophilic statins increase cytotoxicity and cell death compared to hydrophilic statins, both in microglia and neurons. In microglia, this cytotoxicity was independent of ROS at early time points and was accompanied by a more pro-inflammatory phenotype in lipophilic statins. We observed an increase in mevalonate pathway products during microglial infection with ZIKV, including cholesterol and isoprenoids. Furthermore, treatment with rosuvastatin reduced oxidative stress in infected cells and prevented ZIKV-induced microglial viability loss without altering viral load. These findings provide valuable insights into the possible mechanisms underlying neurological adverse effects associated with statin use, as well as the identification of potential targets for more effective therapeutic interventions against ZIKV.

Keywords: Statins, Cholesterol, Microglia, ZIKV, Adverse effects

Sumário

Resumo	6
Abstract.....	7
Sumário.....	9
Lista de figuras	12
Lista de abreviaturas e siglas	13
1. Introdução	16
1.1. Estatinas.....	16
1.2. Farmacodinâmica e farmacocinética de estatinas.....	18
1.3. Classificação de estatinas.	20
1.4. Efeitos Adversos	21
1.5. Micróglia	24
1.6. Estatinas em infecções virais.....	26
1.7. Orthoflavivírus	27
1.1. ZIKV.....	28
1.2. História do ZIKV	30
1.3. Ciclos de transmissão	31
1.4. Epidemiologia e sintomatologia	31
1.5. Orthoflavivírus e o metabolismo lipídico.....	33
1.6. Colesterol: modulações e papéis em infecções virais.....	34
1.7. Colesterol e respostas antivirais	36
2. Justificativa	37
3. Objetivos.....	38
3.1. Objetivo geral:	38

3.2. Objetivos específicos:.....	39
4. Metodologia.....	39
4.1. Cultura de células	39
4.2. Expansão viral	40
4.3. Titulação viral.....	40
4.4. Condições experimentais.....	41
4.5. Diferenciação para a obtenção de neurônios maduros	42
4.6. Análise da viabilidade Mitocondrial.....	42
4.7. Tipificação da morte celular via ensaio de Anexina V e Iodeto de Propídio (PI).....	42
4.8. Avaliação da liberação de LDH.....	43
4.9. Ensaio cinético de medição da formação de poros na membrana	44
4.10. Ensaio cinético da formação de espécies reativas de oxigênio	44
4.11. Ensaio da geração de espécies reativas de oxigênio por citometria.	44
4.12. ELISA.....	45
4.13. Análise da biogênese de corpúsculo lipídico.....	46
4.14. Extração dos metabólitos e preparo das amostras	47
4.15. Perfil metabólico por GC/MS.....	47
4.16. Extração de RNA e Carga Viral.....	48
4.17. Análise estatística	49
5. Resultados	49
5.1. Estatinas lipofílicas levam a uma maior redução de viabilidade do que a hidrofílica em micróglias humanas.	49
5.2. Estatinas levam à redução da biogênese de corpúsculo lipídico em micróglias humanas. 52	
5.3. Estatinas não modulam a produção de espécies reativas de oxigênio em tempos iniciais em micróglias humanas.	53

5.4. A pitavastatina leva a um perfil mais pró-inflamatório quando comparada à rosuvastatina em micróglias humanas.	54
5.5. Estatinas levam a um aumento de morte celular, especialmente apoptose, em micróglias humanas.	55
5.6. Em neurônios, estatinas lipofílicas levam a uma maior citotoxicidade em comparação com a estatina hidrofílica.	61
5.7. O ZIKV induz a produção de metabólitos da via do mevalonato em micróglias humanas.	64
5.8. A rosuvastatina inibe a redução de viabilidade causada pelo ZIKV no tempo de 48 horas em micróglias humanas.....	66
5.9. A rosuvastatina tem efeito antioxidante contra a ação do vírus Zika (ZIKV) em micróglias humanas após 96 horas.	67
5.10. A rosuvastatina não reduz a carga viral de micróglias infectadas com o ZIKV no tempo de 48 horas.	68
6. Discussão	69
6.1. Busca de possíveis mecanismos para efeitos citotóxicos neurológicos de estatinas... ..	69
6.2. Impacto de estatinas na infecção microglial com o ZIKV.....	74
7. Conclusões	79
8. Perspectivas e limitações	80
9. Referências	81

Lista de figuras

<i>Figura 1. Uso de estatinas mundialmente em 2020.</i>	16
<i>Figura 2. Linha do tempo referente à história de estatinas.</i>	17
<i>Figura 3. Estrutura química de estatinas e seu mecanismo de ação.</i>	18
<i>Figura 4. Diferentes gerações de estatinas e seus métodos de produção. Fonte:</i>	20
<i>Figura 5. Estatinas lipofílicas e hidrofílicas.</i>	21
<i>Figura 6. Efeitos adversos de estatinas e seus mecanismos.</i>	23
<i>Figura 7. Genoma do ZIKV.</i>	29
<i>Figura 8. Ciclo de infecção viral do ZIKV.</i>	30
<i>Figura 9. Ciclo de transmissão do ZIKV.</i>	31
<i>Figura 10. Casos prováveis e coeficiente de incidência por estado no Brasil em 2024.</i>	32
<i>Figura 11. Processos celulares influenciados por jangadas lipídicas.</i>	35
<i>Figura 12. Impacto da via de interferon no metabolismo de colesterol.</i>	37
<i>Figura 13. Condições de cultivo celular e forma de realização do estímulo envolvendo a infecção com o ZIKV.</i>	41
<i>Figura 14. Estratégia de gate em citometria de fluxo para células viáveis e singlets para análise da geração de espécies reativas de oxigênio.</i>	45
<i>Figura 15. Células microgliais tratadas com diferentes estatinas durante 24h.</i>	50
<i>Figura 16. Células microgliais tratadas com diferentes estatinas durante 48 horas.</i>	51
<i>Figura 17. Análise da biogênese de corpúsculo lipídico em micróglia tratada com estatinas.</i>	52
<i>Figura 18. Produção de espécies reativas em células microgliais tratadas com estatinas.</i>	54
<i>Figura 19. Análise da secreção de citocinas de células microgliais tratadas com estatinas.</i>	55
<i>Figura 20. Ensaio de formação em células microgliais tratadas com estatinas.</i>	56
<i>Figura 21. Liberação de LDH de células tratadas ou não com estatinas.</i>	57
<i>Figura 22. Tipificação da morte celular de micróglia tratada com estatinas.</i>	58
<i>Figura 23. Tipificação da morte celular de células tratadas com estatinas.</i>	61
<i>Figura 24. Viabilidade mitocondrial de neurônios tratados com estatinas.</i>	62
<i>Figura 25. Liberação de Lactato desidrogenase (LDH) de neurônios tratados com estatinas.</i>	63
<i>Figura 26. Perfil metabólico de células microgliais infectadas com ZIKV.</i>	65
<i>Figura 27. Efeito das estatinas na viabilidade mitocondrial de micróglia infectada pelo ZIKV.</i>	66
<i>Figura 28. Produção de ROS em micróglia infectada com ZIKV e tratada com estatinas.</i>	68
<i>Figura 29. Carga viral de micróglia tratada ou não com rosuvastatina e infectada com o ZIKV.</i>	69
<i>Figura 30. Conclusões acerca dos mecanismos citotóxicos de estatinas.</i>	79
<i>Figura 31. Conclusões acerca do impacto de estatinas na infecção microglial com ZIKV.</i>	80

Lista de abreviaturas e siglas

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
Proteína C	Proteína de Capsídeo
CNS	<i>Central nervous system</i>
CYP450	<i>Cytochrome P450</i>
DFC-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluorescina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Proteína E	Proteína de Envelope
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FASN	<i>Fatty acid synthase</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
GC-MS	<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>
GGPP	Difosfato de geranylgeranil
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HEPES	Ácido 4- (2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
HMGCR	<i>3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase,</i>
IFITM3	<i>interferon induced transmembrane protein 3</i>
IFN – γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleucina 1 β

IL-6	Interleucina 6
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>Low density lipoprotein receptor</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MTT	<i>(3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)</i>
MuRF1	<i>Muscle-specific RING finger protein 1</i>
M β CD	Metil- β -ciclodextrina
NAC	N-acetilcisteína
NPC	<i>Niemann Pick Disease Type C</i>
NS	Não estrutural
OATP	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide</i>
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i>
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PrM	<i>Premembrane protein</i>
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen species</i>
RPE	<i>Retinal pigment epithelium cells</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SREBP2	<i>Sterol regulatory element-binding protein 2</i>
ssRNA	<i>Single strand Ribonucleic acid</i>

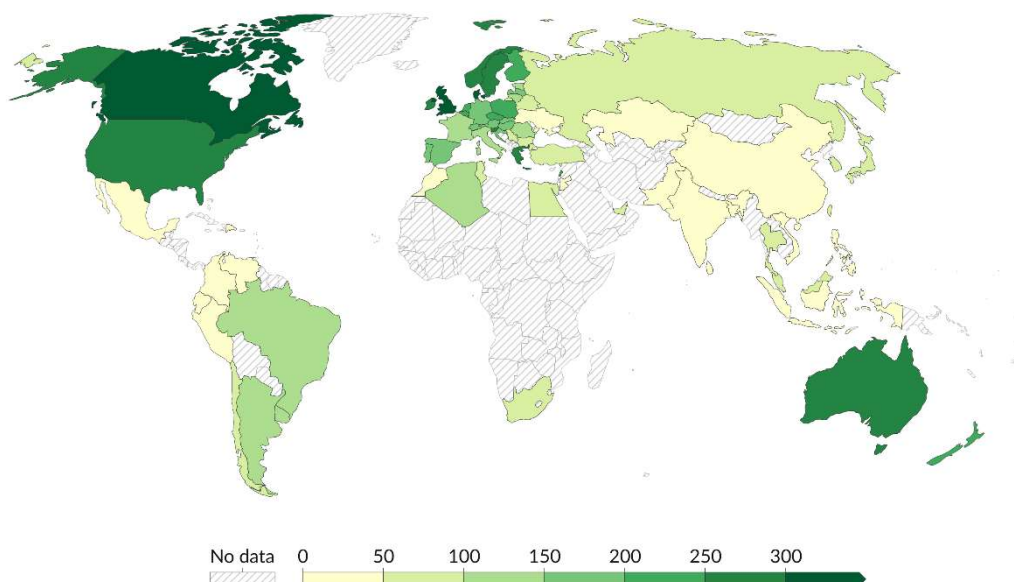
TIM	<i>T-cell immunoglobulin and mucin</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
WNV	<i>West nile virus</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>
ZIKV	<i>Zika virus</i>

1. Introdução

1.1. Estatinas

Statin use, 2020

The use of statins¹, measured in Defined Daily Doses², per 1,000 people.



Data source: Guadamuz, Shooshtari and Qato (2022)

OurWorldinData.org/cardiovascular-diseases | CC BY

Figura 1. Uso de estatinas mundialmente em 2020. Fonte: [Our World in Data](https://ourworldindata.org)

As estatinas são fármacos amplamente utilizados no tratamento da hipercolesterolemia, promovendo efeitos hipolipemiantes e, consequentemente, contribuindo para a redução e prevenção de eventos vasculares e outras complicações clínicas (COLLINS et al., 2016). Além da modulação dos níveis lipídicos, essas drogas apresentam efeitos pleiotrópicos, principalmente devido à inibição da síntese de isoprenoides. Por um lado, as estatinas estão associadas a benefícios adicionais, como efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e, sobretudo, hipolipemiantes (SHISHEHBOR et al., 2003). Essas propriedades motivaram investigações sobre o possível benefício desses fármacos em outros contextos, incluindo infecções virais (BAJIMAYA et al., 2017). Por outro lado, o uso de estatinas está relacionado a uma ampla gama de efeitos adversos, o que contribui para uma taxa significativa de descontinuação do tratamento. Entre as reações indesejadas, destacam-se efeitos musculares, alterações hepáticas e renais, além de possíveis disfunções no SNC (THOMPSON et al., 2016). No entanto, os mecanismos

envolvidos nesses efeitos, especialmente os relacionados ao sistema nervoso central (SNC), ainda não estão completamente elucidados.

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de mortalidade global. Em 2021, essas doenças foram responsáveis por aproximadamente 20,5 milhões de óbitos (DI CESARE et al., 2024). Diante desse cenário, não surpreende que as estatinas estejam entre os medicamentos mais prescritos mundialmente (Figura 1), tendo registrado cerca de 148 milhões de usuários anuais em 2018 (BLAIS et al., 2021a).

Além das estatinas, outros fármacos hipolipemiantes incluem a ezetimiba, que reduz a absorção intestinal de colesterol; os fibratos, que diminuem a síntese de triglicerídeos; e os inibidores de PCSK9, que impedem a degradação do receptor de LDL (LDLR) e, assim, aumentam sua captação (Michaeli et al., 2023).

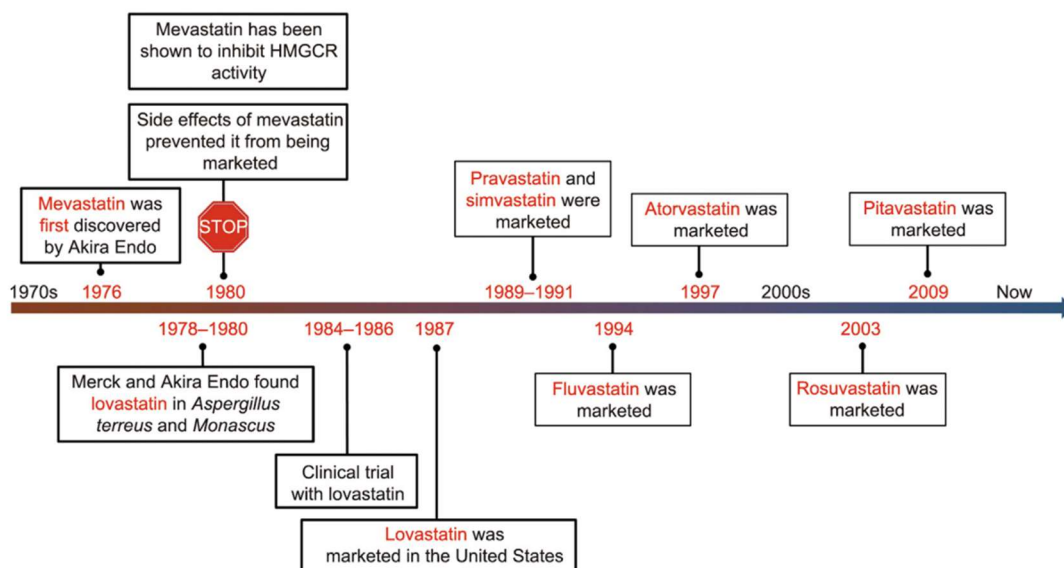


Figura 2. Linha do tempo referente à história de estatinas. Fonte: (TANG, X. L. et al., 2023)

As estatinas foram descobertas em 1976, quando a mevastatina foi isolada a partir de um produto de fermentação do fungo *Penicillium citrinum* (Figura 2). Esse composto demonstrou a capacidade de inibir a HMG-CoA redutase (HMGCR) e reduzir os níveis de colesterol *in vivo* (ENDO; KURODA; TSUJITA, 1976). Em estudos clínicos, a redução do LDL atingiu até 30%, evidenciando sua elevada eficácia hipolipemiante (YAMAMOTO; SUDO; ENDO, 1980). No entanto, devido à alta incidência de efeitos colaterais em testes com animais, a mevastatina foi impedida de chegar ao mercado em 1980 (ENDO; BEPPU, 2010). Posteriormente, um composto estruturalmente semelhante à mevastatina foi isolado a partir da fermentação de *Aspergillus terreus* e recebeu o nome de lovastatina (ENDO; BEPPU, 2010). Esse fármaco foi aprovado pela *Food and Drug*

Administration (FDA) e lançado no mercado em 1987. Já no primeiro ano de comercialização, tornou-se o medicamento mais vendido do mundo, com um faturamento de 260 milhões de dólares (TANG, X. L. et al., 2023). Subsequentemente, outras estatinas foram desenvolvidas e comercializadas, incluindo a sinvastatina, a rosuvastatina e a pitavastatina.

1.2. Farmacodinâmica e farmacocinética de estatinas

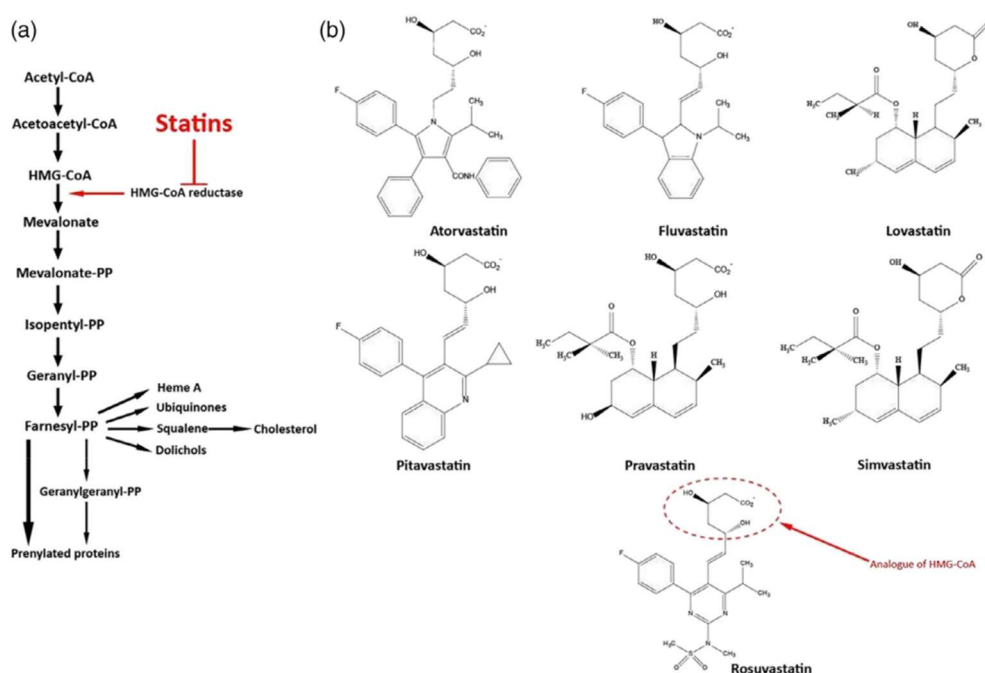


Figura 3. Estrutura química de estatinas e seu mecanismo de ação. Fonte (BAGHERI et al., 2020)

Em termos de mecanismo de ação, estatinas atuam na via do mevalonato, que leva à produção de colesterol, reduzindo especificamente a conversão de HMG-CoA em mevalonato (Figura 3). Esses fármacos apresentam um sítio estrutural que mimetiza a HMG-CoA, ligando-se ao sítio catalítico da HMGCR e inibindo competitivamente a sua atividade (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001).

Além da redução do colesterol, as estatinas também inibem a síntese de isoprenoides, moléculas essenciais para modificações pós-traducionais de proteínas. Supõe-se que parte da eficácia das estatinas decorra não apenas de seus efeitos hipolipemiantes, mas também de seus efeitos anti-inflamatórios, atribuídos à redução da síntese de isoprenoides (LIAO, 2002). Essa hipótese é reforçada por evidências que indicam que a inflamação é tão preditora de eventos cardiovasculares quanto os níveis de LDL (RIDKER et al., 2002). Além disso, em comparação com outros agentes

hipolipemiantes, mesmo comparando pacientes com iguais reduções de LDL, a terapia com estatinas demonstra maior eficácia na melhora da função endotelial (LANDMESSER et al., 2005).

As estatinas são administradas por via oral e apresentam baixa biodisponibilidade devido ao efeito de primeira passagem (TSE; JAFFE; TROENDLE, 1992). No plasma, são transportadas predominantemente ligadas a proteínas, especialmente à albumina, com exceção da pravastatina (WILLIAMS; FEELY, 2012). A captação celular ocorre por meio de transportadores de ânions orgânicos (*organic anion-transporting polypeptides* – OATP) (KALLIOKOSKI; NIEMI, 2009). Embora o fígado seja o principal alvo das estatinas, esses fármacos também podem ser captados por tecidos extra-hepáticos. O metabolismo ocorre principalmente por enzimas do complexo de isoenzimas do citocromo P450 (CYP450) (BOTTORFF; HANSTEN, 2000). Quanto ao efluxo de estatinas, este é mediado por transportadores ABC (DENG et al., 2021). A sinvastatina e a lovastatina são administradas como pró-fármacos em sua forma lactônica, necessitando de clivagem enzimática por esterases para serem convertidas na forma hidroxíacida ativa (ALBERTS, 1990). As demais estatinas, por sua vez, são majoritariamente administradas já na forma ativa. A eliminação ocorre, em grande parte, sem modificações metabólicas, resultando em baixa excreção renal (SINGHVI et al., 1990).

1.3. Classificação de estatinas.

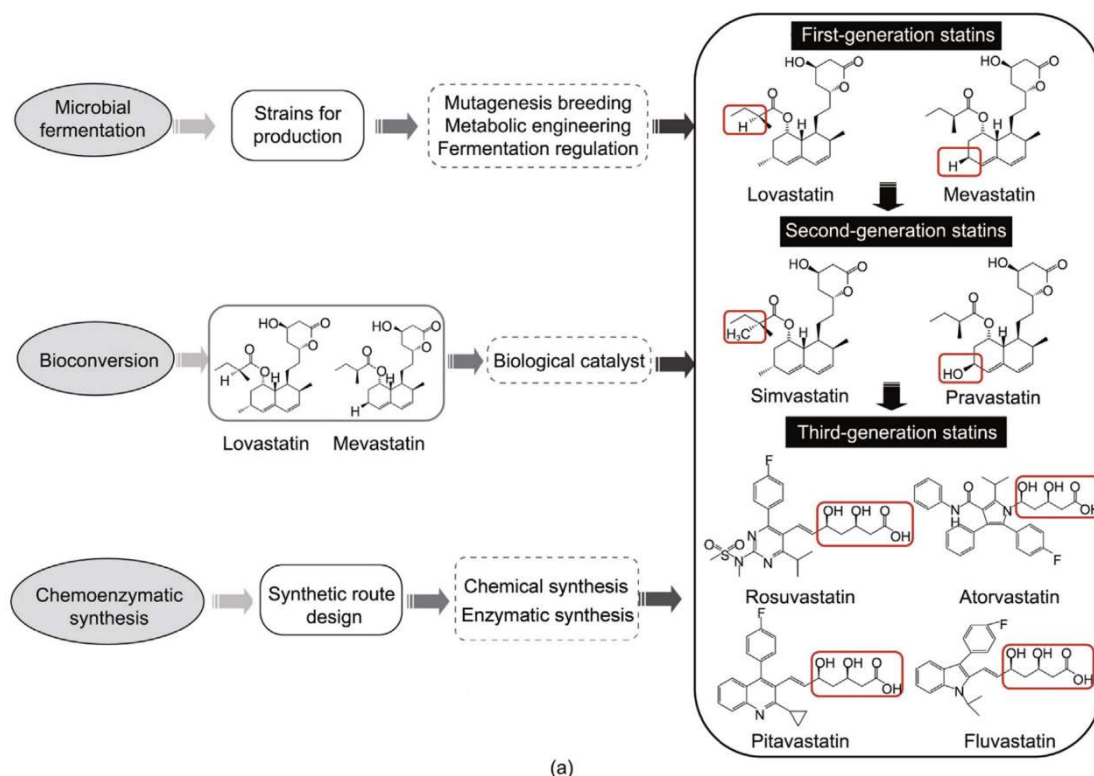


Figura 4. Diferentes gerações de estatinas e seus métodos de produção. Fonte: (TANG, X. L. et al., 2023).

As estatinas podem ser classificadas com base em pelo menos dois critérios principais. O primeiro refere-se à forma de obtenção (Figura 4). Estatinas derivadas diretamente da fermentação fúngica são denominadas estatinas de primeira geração, como a lovastatina e a mevastatina. As estatinas de segunda geração ainda utilizam fermentação, mas passam por etapas adicionais de catálise, como ocorre com a sinvastatina e a pravastatina. Já as estatinas de terceira geração são obtidas exclusivamente por síntese química, como a rosuvastatina e a pitavastatina (TANG, X. L. et al., 2023). Existe uma relação entre a potência de inibição da HMGCR e a geração, sendo que as de terceira geração podem ser até dez vezes mais potentes do que as de primeira geração (SIERRA et al., 2011).

O segundo critério de classificação diz respeito à afinidade com a água (Figura 5). Estatinas lipofílicas, como a sinvastatina e a pitavastatina, apresentam maior capacidade de atravessar membranas celulares e, conseqüentemente, podem atuar em tecidos extra-hepáticos, o que está associado a um maior risco de efeitos adversos. Por outro lado, estatinas hidrofílicas, como a rosuvastatina e a pravastatina, possuem menor

permeabilidade passiva e dependem mais de transportadores específicos para sua captação celular (GÓMEZ-HUEL GAS et al., 2021).

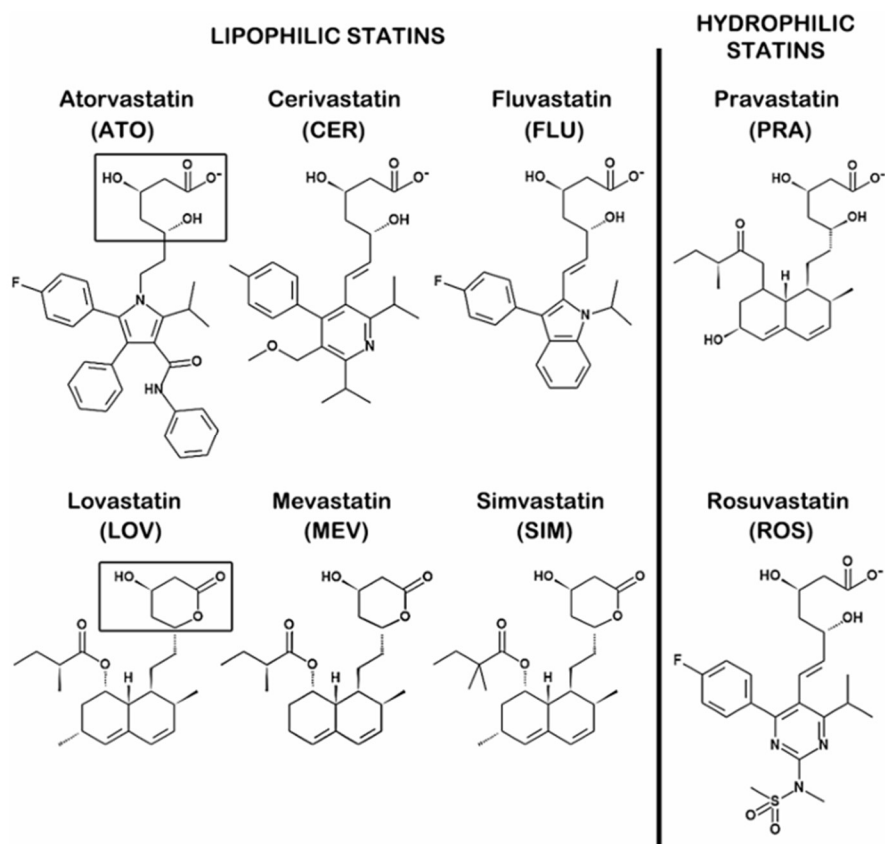


Figura 5. Estatinas lipofílicas e hidrofílicas. Fonte (ESPAÑO et al., 2019).

1.4. Efeitos Adversos

Atualmente, o paradigma do tratamento para doenças cardiovasculares considera que não há um limite inferior estabelecido, e o objetivo da terapia é reduzir ao máximo os níveis de LDL, ao menos em pacientes com alto risco de eventos cardiovasculares (MACH et al., 2020). Uma redução nos níveis de LDL de 38mg/dl pode levar a uma redução de 25% a chance de acidentes cardiovasculares. Da mesma forma, uma redução de 77 mg/dL pode levar a uma queda de até 45% nesse risco. As estatinas são capazes de reduzir os níveis de LDL em até 58%, o que pode resultar em uma redução da taxa de mortalidade de pacientes em até 28% (COLLINS et al., 2016; NOWAK et al., 2022). Portanto, as estatinas demonstram elevada eficácia para o propósito ao qual foram

desenvolvidas, e seus benefícios superam os riscos nessas circunstâncias. No entanto, o uso dessas medicações não é isento de efeitos adversos. As estatinas estão associadas a uma ampla variedade de reações adversas (Figura 6), que podem comprometer a adesão ao tratamento e resultar em taxas de descontinuação elevadas, atingindo até 40% dos pacientes em determinados casos (COLANTONIO et al., 2019).

Entre as reações adversas mais prevalentes, destacam-se os efeitos musculares, que podem afetar até 29% dos pacientes, manifestando-se como dor, fraqueza, câibras e, em casos raros, rabdomiólise ou miopatia autoimune necrosante (COHEN et al., 2012). Além das manifestações musculares, há relatos de alterações hepáticas, incluindo elevações nos níveis de aminotransferases (AVERBUKH et al., 2022). Estatinas podem, inclusive, estar associadas a disfunções renais, como a lesão renal aguda (CORRAO et al., 2014). Efeitos sobre o sistema nervoso central também têm sido informados por pacientes. Diversos estudos de caso relatam possíveis associações entre o uso de estatinas e comprometimento cognitivo, incluindo perda de memória (WAGSTAFF et al., 2003). Dois ensaios clínicos conduzidos em indivíduos com hipercolesterolemia identificaram pequenas reduções cognitivas em pacientes tratados com sinvastatina ou lovastatina (MULDOON et al., 2000, 2004). Além disso, entre os eventos adversos autorrelatados por usuários de estatinas, os sintomas cognitivos aparecem como os segundos mais frequentes, logo após os efeitos musculares (GOLOMB et al., 2007). Outros efeitos adversos relatados incluem cefaleia e distúrbios do sono (ASHAYEKHI et al., 2011; TRAMBOWICZ et al., 2023). Em razão dessas evidências, a agência regulatória norte-americana (FDA) incluiu nos rótulos das estatinas alertas sobre possíveis efeitos adversos relacionados ao SNC (FDA, 2012).

O principal mecanismo hipotetizado para os efeitos musculares das estatinas envolve a via de sinalização PI3K/Akt, que desempenha um papel central na regulação da síntese e degradação proteica. Essa via atua por meio da ativação de alvos específicos, como a proteína mTOR, que promove a síntese proteica, e a proteína FOXO, que estimula a degradação proteica. A ativação de FOXO resulta na indução de ligases de ubiquitina, como atrogina-1 e Muscle-specific ring finger 1 (MuRF1), promovendo a atrofia muscular. A fosforilação de AKT leva a uma fosforilação e inibição da proteína FOXO, impedindo sua translocação nuclear. Pequenas proteínas G preniladas, reduzidas durante o uso de estatinas, estão associadas a fosforilação da AKT, portanto a redução destas pode levar ao comprometimento dessa via (THOMPSON et al., 2016).

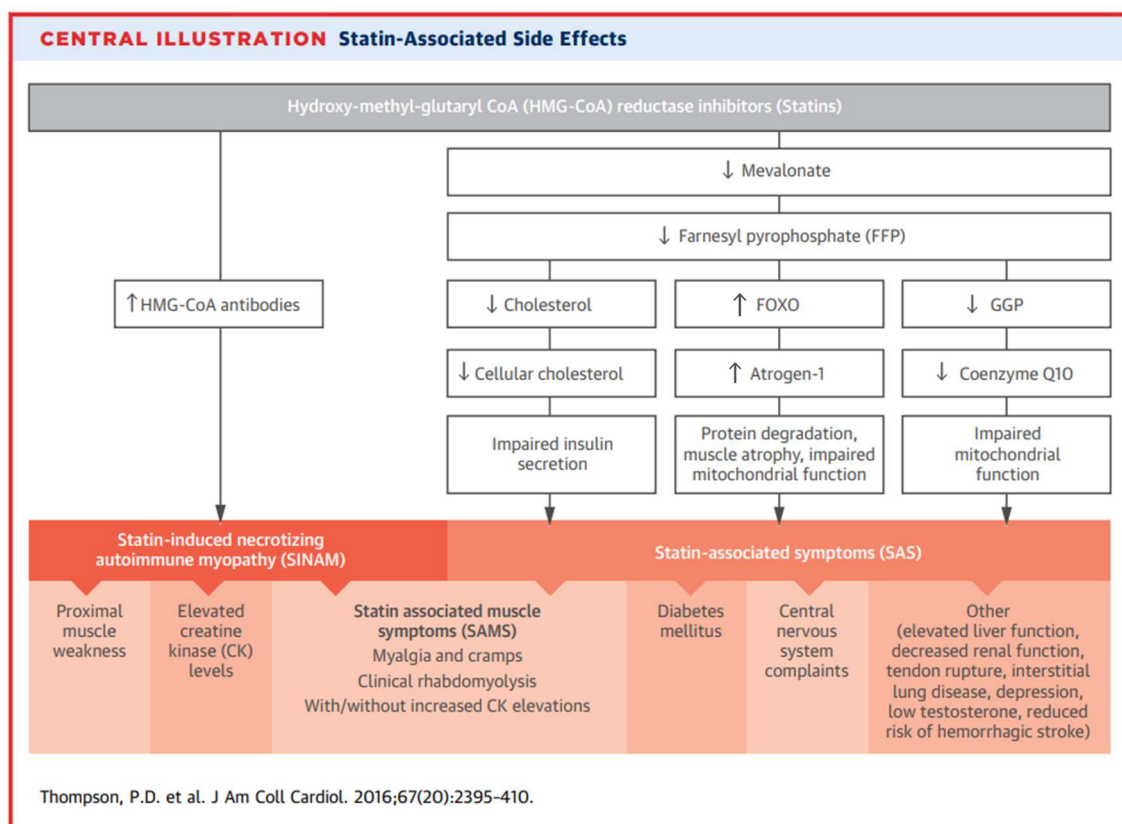


Figura 6. Efeitos adversos de estatinas e seus mecanismos. Adaptado de (THOMPSON et al., 2016)

Evidências experimentais reforçam essa hipótese. Estudos *in vitro*, por exemplo, demonstraram que o geranilgeranil-pirofosfato (GGPP), um intermediário da via do mevalonato, pode prevenir danos musculares induzidos por estatinas (CAO et al., 2009). Além disso, a atrogina-1 apresenta expressão elevada em biópsias musculares de pacientes que desenvolveram efeitos adversos musculares associados ao uso dessas medicações (HANAI et al., 2007).

Outro possível mecanismo envolve a disfunção mitocondrial, atribuída à redução da coenzima Q10, um carreador essencial de elétrons na cadeia transportadora, cuja biossíntese também depende dos isoprenoides. Evidências sugerem que a capacidade de fosforilação oxidativa é reduzida em biópsias musculares de pacientes tratados com estatinas (LARSEN et al., 2013). Em alguns casos, também foi observada uma diminuição da coenzima Q10 em amostras musculares desses pacientes (PÄIVÄ et al., 2005). Embora seja possível delinear os mecanismos subjacentes à toxicidade muscular induzida por estatinas, os processos que explicam os efeitos adversos no SNC permanecem incertos. Portanto, investigações adicionais são essenciais para esclarecer essa questão.

As estatinas lipofílicas, devido à sua maior permeabilidade de membrana, conseguem cruzar a barreira hematoencefálica e sua presença já foi detectada diretamente no líquido cefalorraquidiano de pacientes (BOTTI et al., 1991). Por outro lado, as estatinas hidrofílicas não foram identificadas diretamente no tecido cerebral humano, mas evidências provenientes de modelos *in vivo* sugerem a possibilidade de presença no SNC (JOHNSON-ANUNA et al., 2005; SAHEKI et al., 1994; THELEN et al., 2006). Além disso, a presença de transportadores específicos para a captação de estatinas no SNC reforça essa hipótese. O transportador OATP1A2, por exemplo, é expresso em células endoteliais e astrócitos, que compõem a barreira hematoencefálica, bem como em neurônios corticais e micróglia, o que pode facilitar a entrada dessas moléculas no cérebro (BRONGER et al., 2005; GAO et al., 2015; SCHÄFER et al., 2020). Por fim, em estudos clínicos, observou-se uma redução dos níveis de 24-hidroxicolesterol (24-OHC) em indivíduos tratados com pravastatina, uma estatina hidrofílica. Como a conversão de colesterol em 24-OHC representa a principal via de eliminação do colesterol no SNC, essa redução sugere um impacto das estatinas na homeostase lipídica cerebral (VEGA et al., 2003). Dada a presença de estatinas no SNC e seus efeitos adversos nesse contexto, seria importante investigar o seu impacto em modelos capazes de indicar possíveis mecanismos moleculares associados.

1.5. Micróglia

As micróglia são células imunes residentes do SNC, representando cerca de 10% das células desse sistema e desempenhando funções fundamentais. É crescente o número de publicações na literatura relacionando alterações microgлияis, seja por fatores genéticos,

infecciosos ou farmacológicos, a desordens ou disfunções no SNC (BILBO et al., 2018; VINNAKOTA et al., 2024; ZHOU, Y. D. et al., 2009). Durante o desenvolvimento embrionário, essas células originam-se no saco vitelínico a partir de precursores positivos para RUNX1 e c-Kit, mas negativos para CD45. Posteriormente, esses precursores migram para o SNC (SALTER; STEVENS, 2017).

Apesar de se manterem relativamente fixas quando não ativadas, as micróglia permanecem em constante monitoramento do ambiente cerebral por meio de suas múltiplas projeções, garantindo a vigilância imunológica do SNC (DAVALOS et al., 2005). As micróglia também exercem influência direta sobre a plasticidade sináptica, sendo essenciais para a poda sináptica durante o desenvolvimento e para processos como a potenciação e a depressão de longo prazo, fundamentais para aprendizado e memória (RAGHURAMAN et al., 2019; TREMBLAY; LOWERY; MAJEWSKA, 2010).

Dada a diversidade de processos nos quais estão envolvidas, micróglia influenciam o comportamento, o sono e a sensação de dor, dependente ou independentemente de processos inflamatórios. Há ampla evidência de que tanto a inflamação sistêmica quanto a inflamação *in situ* no cérebro estão correlacionadas a disfunções no SNC (HARRIS, 2024; KIPINOINEN et al., 2022). A inflamação é um ponto de convergência em doenças neurodegenerativas e, além disso, citocinas alteram propriedades eletrofisiológicas das sinapses, modulando sinapses excitatórias e inibitórias, seja diretamente ou por meios transcrpcionais, promovendo implicações comportamentais (VAINCHTEIN et al., 2018; VIVIANI et al., 2003; WANG, Y. et al., 2021). Além disso, em camundongos, as micróglia desempenham um papel na regulação do sono e o mecanismo envolve redução dos níveis de norepinefrina. Também é descrita a influência microglial na regulação da dor em modelos de dor neuropática, via uma ativação por meio do receptor P2X4R, que leva à liberação de BDNF e inibição da supressão da transmissão da dor (BEGGS; TRANG; SALTER, 2012).

Ressaltando a importância microglial no SNC, suas disfunções se associam com efeitos deletérios. Em modelos de traumatismo, a ativação microglial correlaciona-se a declínios cognitivos (SABA et al., 2021). Em distúrbios neurológicos, como autismo, epilepsia e esquizofrenia, observa-se um aumento nos parâmetros de ativação microglial, além de alterações na poda sináptica. Essas mudanças podem levar tanto à perda excessiva de sinapses quanto à sua poda insuficiente, resultando em circuitos neurais imaturos (GOBER et al., 2022; GUPTA et al., 2014; MORGAN et al., 2010; SEKAR et

al., 2016; ZHOU, Y. D. et al., 2009). Por fim, alterações neurológicas adversas na imunoterapia contra o câncer com anti-PD-1 estão relacionadas com o aumento de marcadores de ativação microglial (VINNAKOTA et al., 2024). Portanto, alterações ambientais ou genéticas, assim como as farmacológicas, podem gerar alterações microgliais e implicações no SNC.

Durante infecções, micróglia identificam padrões moleculares relacionados a patógenos (PAMPs) por meio de receptores Toll-like (TLR) e desenvolvem um fenótipo ameboide, com um padrão de secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, de modo a resolver a infecção (WOODBURN; BOLLINGER; WOHLEB, 2021). São a linha de frente imunologicamente, sendo a sua atuação fundamental para a proteção do SNC. Apesar disso, micróglia também podem levar a efeitos negativos durante infecções. Essas células são infectáveis pelo vírus Zika (ZIKV) e, mesmo após a recuperação da infecção, uma ativação microglial persiste e pode levar à redução de terminais pós-sinápticos e a déficits espaciais e cognitivos (GARBER et al., 2019; OLIVEIRA, F. B. C. de et al., 2023). Células precursoras microgliais podem atuar como cavalos de troia, mediando a infecção de outros tecidos, como acontece na transmissão vertical do ZIKV (XU et al., 2020). Por outro lado, micróglia residentes do SNC desempenham um papel protetivo ao feto (ABDELBASSET et al., 2024). Em modelos murinos, infecções pré-natais resultam em proles com alterações comportamentais associadas a transtornos do neurodesenvolvimento, como o autismo, ou transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia (SHI et al., 2003; ZUCKERMAN et al., 2003). Portanto, durante infecções, a resposta microglial pode desencadear tanto efeitos protetores quanto deletérios, reforçando a importância de investigar infecções que afetam o SNC e como micróglia são impactadas nesse processo.

1.6. Estatinas em infecções virais

Além dos efeitos hipolipemiantes, o uso de estatinas está associado tanto a uma redução de parâmetros clínicos sistêmicos de inflamação, como a proteína C-reativa (CRP) e a interleucina 6 (IL-6), quanto a efeitos antioxidantes sistêmicos (MILAJERDI et al., 2020; SHISHEHBOR et al., 2003). A partir disso, o uso de estatinas vem sendo

estudado em outros contextos além da prevenção e tratamento de acidentes cardiovasculares.

A aterosclerose é um fator de risco para o Alzheimer, que, por sua vez, está associado ao aumento de marcadores inflamatórios no cérebro (HOFMAN et al., 1997; JANELIDZE et al., 2018). Uma meta-análise, englobando mais de cinco milhões de pacientes, identificou uma redução do risco de Alzheimer em até 32% em usuários de estatinas (OLMASTRONI et al., 2022).

Em doenças caracterizadas por inflamação crônica, como a artrite reumatoide, as estatinas estão associadas à melhora de parâmetros patológicos, como dor e inchaço nas articulações (OKAMOTO et al., 2007). Adicionalmente, em infecções virais, estatinas também demonstraram efeitos positivos (BAJIMAYA et al., 2017).

O uso de estatinas foi capaz de afetar etapas do ciclo viral em modelos *in vitro* e, em pacientes, levou a um melhor prognóstico. A lovastatina, por exemplo, foi capaz de reduzir a montagem de partículas de vírus da parainfluenza tipo I (BAJIMAYA et al., 2017). Outra estatina demonstrou efeitos protetivos contra SARS-CoV 2 tanto no modelo *in vitro* como *in vivo*, reduzindo a replicação viral e a mortalidade (Teixeira et al., 2022). Quanto ao ZIKV, estatinas lipofílicas, como a lovastatina e atorvastatina, demonstraram capacidade de reduzir a entrada viral, resultando em menor produção e liberação de partículas virais maduras em um modelo de células renais de primatas não humanos (ESPAÑO et al., 2019; STOYANOVA et al., 2022). Clinicamente, o uso de estatinas está ligado a uma redução de infecções virais em pacientes com hiperlipidemia, e uma redução da mortalidade em pacientes diagnosticados com influenza (VANDERMEER et al., 2012; WU et al., 2022).

Mecanicamente, esse efeito promissor em infecções virais se relaciona, principalmente, com redução da síntese de colesterol, que é uma molécula essencial para diferentes etapas do ciclo viral. Dentre gêneros virais, os Orthoflavivírus apresentam grandes modulações do metabolismo lipídico e, em especial, do colesterol, durante a infecção, o que os tornam relevantes para abordagens que visam reduzir a síntese deste.

1.7. Orthoflavivírus

Membros da família *Flaviviridae* são denominados flavivírus (do latim *flavus*, amarelo). Essa família engloba os gêneros *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Orthoflavivirus*. O gênero *Orthoflavivirus* engloba patógenos que causam um enorme impacto sanitário, especialmente em países tropicais e subtropicais, como o vírus da Febre Amarela (YFV), o vírus do Nilo ocidental (WNV), o vírus da Dengue (DENV) e o vírus Zika (ZIKV) (WILHELMINA VAN LEUR et al., 2021).

Os Orthoflavivírus, vírus pertencentes ao gênero *Orthoflavivirus*, apresentam como características um diâmetro de cerca de 50 nm e um genoma de RNA de fita simples de senso positivo com aproximadamente 10 kb. Esses vírus apresentam um *cap* do tipo 1 na região 5' de seus genomas e não apresentam poliadenilação na região 3'. São vírus envelopados, e os lipídios podem corresponder a cerca de 17% do peso da partícula viral (SIMMONDS et al., 2017). Além disso, são vírus transmitidos por artrópodes e infectam mamíferos (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018).

1.1. ZIKV

O ZIKV pertence ao gênero *Orthoflavivirus* e não possui nenhum tratamento ou vacina aprovados por agências de saúde governamentais. Assim como outros Orthoflavivírus, a infecção com o ZIKV leva a um aumento de colesterol (SINGH, S. et al., 2024). Quanto ao tropismo tecidual, o ZIKV pode infectar os olhos, os tratos reprodutivos, a placenta e o cérebro (MINER; DIAMOND, 2017). Curiosamente, o cérebro é o órgão mais abundante em colesterol, englobando cerca de 25% do colesterol total do organismo em humanos (BJÖRKHEM; MEANEY, 2004). Apesar disso, pouco se sabe sobre o papel do colesterol em infecções com o ZIKV em um modelo clinicamente relevante, como no contexto neural, ou ainda, se a redução desse lipídio, via estatinas, poderia trazer benefícios frente à patogênese do ZIKV no SNC.

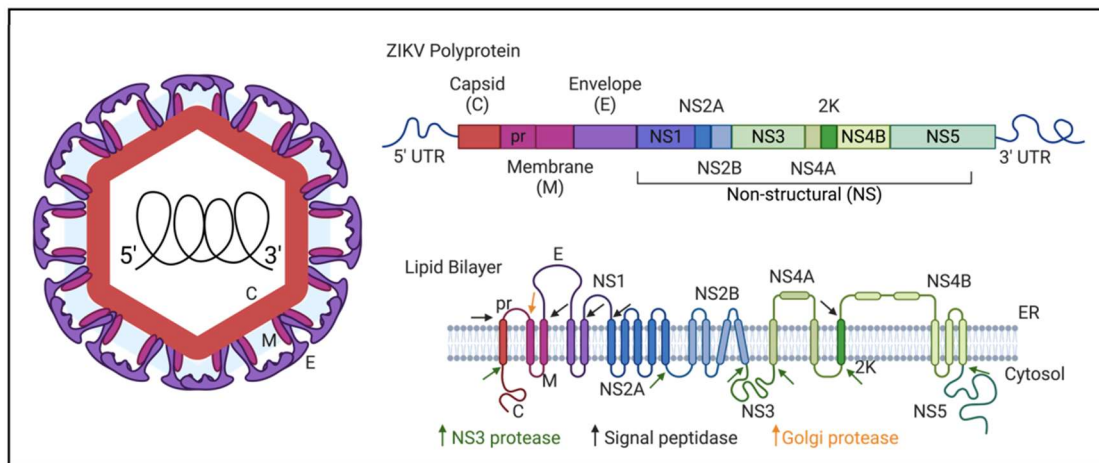


Figura 7. Genoma do ZIKV. Poliproteína viral com sítios de clivagem por proteases indicados por setas. Fonte: (METZLER; TANG, 2024)

O genoma do ZIKV codifica dez proteínas (Figura 7), sendo três estruturais, incluindo a proteína de capsídeo (C), a proteína de envelope (E) e a proteína de pré-membrana (prM), e sete não estruturais, incluindo as proteínas não estruturais (NS) 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B e 5 (BHAT et al., 2023). Esse vírus se replica no citoplasma, onde seu genoma é traduzido em uma única poliproteína, que posteriormente será clivada por proteases virais e por proteases do hospedeiro. As proteínas estruturais têm sua função relacionada à entrada, montagem e estabilidade dessa partícula viral, enquanto proteínas não estruturais estão relacionadas à tradução, replicação e evasão imunológica durante a infecção (BHAT et al., 2023).

A entrada viral é mediada (Figura 8) por receptores como o DC-SIGN, que interage com a proteína E, ou receptores da família TIM (TIM 1, TIM 3, TIM 4) e da família TAM (Tyro3, AXL, MER), que reconhecem, direta ou indiretamente, lipídios negativamente carregados do envelope viral, como a fosfatidilserina (HACKETT; CHERRY, 2018). Isso leva, em última instância, a uma endocitose mediada por clatrina.

A acidificação endossomal leva a modificações estruturais da proteína E, expondo o domínio de fusão, mediando a fusão com a membrana endossomal e a liberação do genoma viral. Esse processo ocorre no retículo endoplasmático, em estruturas membranosas semelhantes a organelas, denominadas complexos de replicação, que propiciam uma replicação viral silenciosa em termos imunológicos (WIELAND et al., 2021).

Partículas virais são montadas na membrana dos complexos de replicação e posteriormente vírions, imaturos, percorrem vias trans-Golgi, onde sofrem ação de

proteases, como a furina, de modo a dar origem a vírus maduros, que posteriormente são exocitados (RENNER et al., 2021).

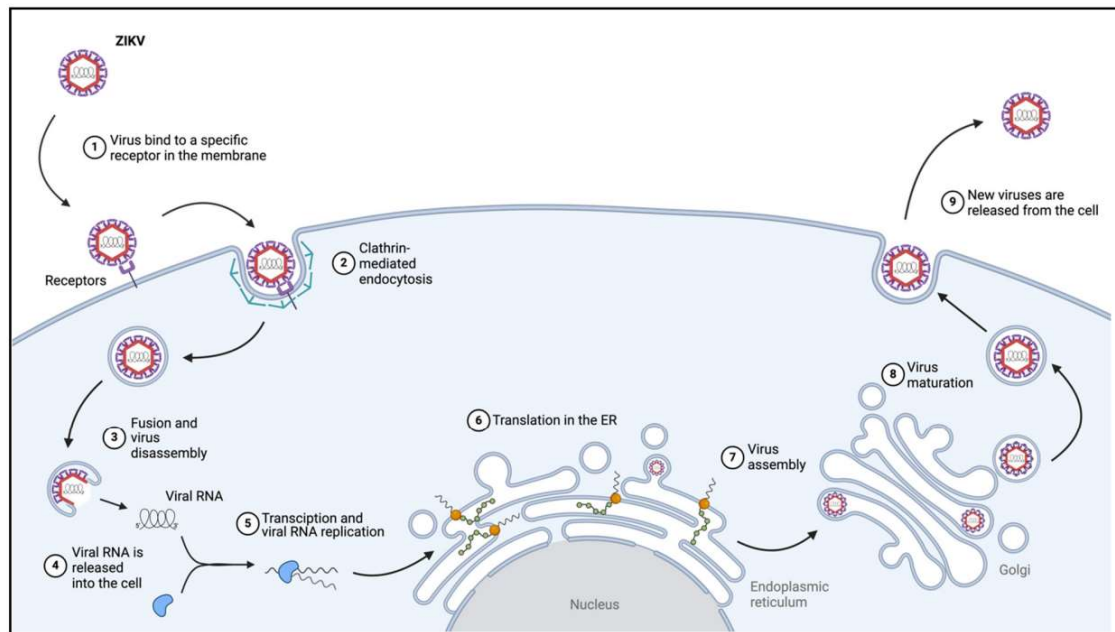


Figura 8. Ciclo de infecção viral do ZIKV. Fonte: (METZLER; TANG, 2024)

1.2. História do ZIKV

O ZIKV foi descoberto em 1947 em Uganda, isolado de primatas não humanos, e poucos casos foram relatados em humanos até 2007 (GW; SF; AJ, 1952). Nesse ano, um surto de ZIKV ocorreu na Micronésia, infectando cerca de 75% da população local (DUFFY et al., 2009). Em 2013, uma epidemia ocorreu na polinésia Francesa, infectando mais de 30 000 pessoas, e, nessa ocasião, observou-se uma correlação entre infecções com o ZIKV e a síndrome autoimune Guillain-Barré (MUSSO; NILLES; CAOLORMEAU, 2014). Em 2015, o Zika emergiu como um grande foco de preocupação para as autoridades sanitárias brasileiras, à medida que um surto na região nordeste acarretou não somente um número de infectados entre 400 000 e 1 300 000, mas também gerou um aumento no número de casos de microcefalia, portanto impactando permanentemente famílias e populações afetadas (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016; KLEBER DE OLIVEIRA et al., 2019; SREATON; CULSHAW; MONGKOLSAPAYA, 2018).

1.3. Ciclos de transmissão

O ZIKV apresenta dois ciclos de transmissão distintos (Figura 9). O ciclo silvático, ou enzoótico, ocorre em ambientes florestais, enquanto o ciclo urbano se desenvolve em áreas densamente povoadas, como cidades (WEAVER et al., 2016). A principal via de infecção ocorre por meio da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, especialmente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, previamente infectadas pelo vírus. A transmissão para os vetores ocorre quando estes se alimentam do sangue de hospedeiros infectados. Embora a infecção tenha sido amplamente documentada em primatas, outros mamíferos e roedores também podem servir como reservatórios (BRÉS, 1970; DARWISH et al., 1983). A introdução de mosquitos infectados em áreas urbanas desencadeia o ciclo de transmissão entre humanos. Além da via vetorial, outras formas de transmissão do ZIKV já foram relatadas, incluindo transmissão vertical, transmissão sexual e transmissão por transfusão sanguínea (MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014).

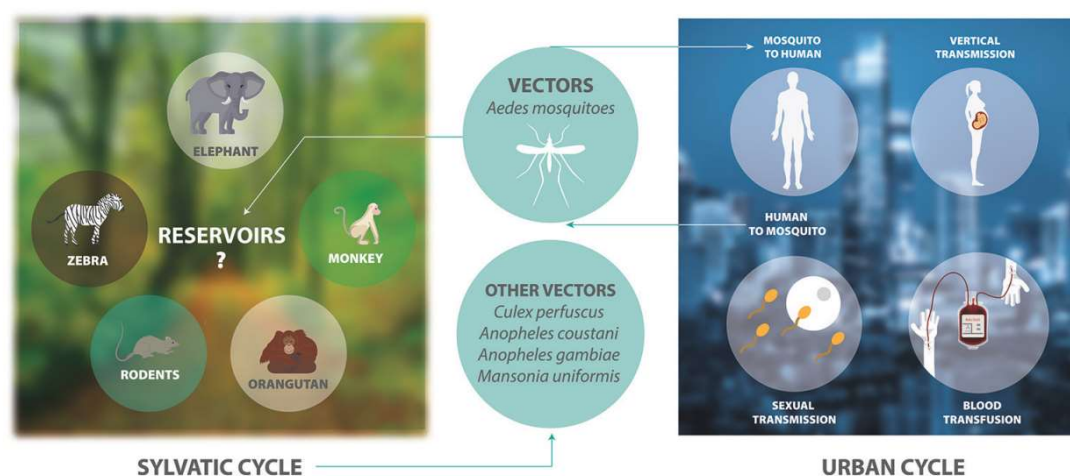


Figura 9. Ciclo de transmissão do ZIKV. Fonte: (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018)

1.4. Epidemiologia e sintomatologia

Em 2021, os vírus YFV, DENV e o ZIKV somaram mais de 59 milhões de infecções ao longo de 124 países ao redor do mundo. De uma perspectiva histórica, para o vírus da dengue, o maior contribuinte para os dados epidemiológicos de flavivírus, houve um

aumento de aproximadamente 85% no número de casos entre 1990 e 2019 (LIANG; DAI, 2024).

O ZIKV já foi confirmado em 89 países do mundo e no Brasil apresentou mais de 6.000 casos prováveis em 2024 (Figura 10) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024). Entretanto, é provável que os dados epidemiológicos estejam subestimando o real impacto dos Orthoflavivírus. Estimativas apontam que somente cerca de 25% dos casos de dengue e 20% dos casos de zika apresentam sintomas ou sinais (BHATT et al., 2013; LAZEAR; DIAMOND, 2016). No Brasil, estimativas de subnotificação dos casos de DENV podem chegar a 95% (SILVA et al., 2016). Isso se relaciona à porcentagem dos casos assintomáticos e à alta subnotificação, possivelmente também associada a estratégia vigilância epidemiológica passiva (LOTTA; NUNES, 2021).

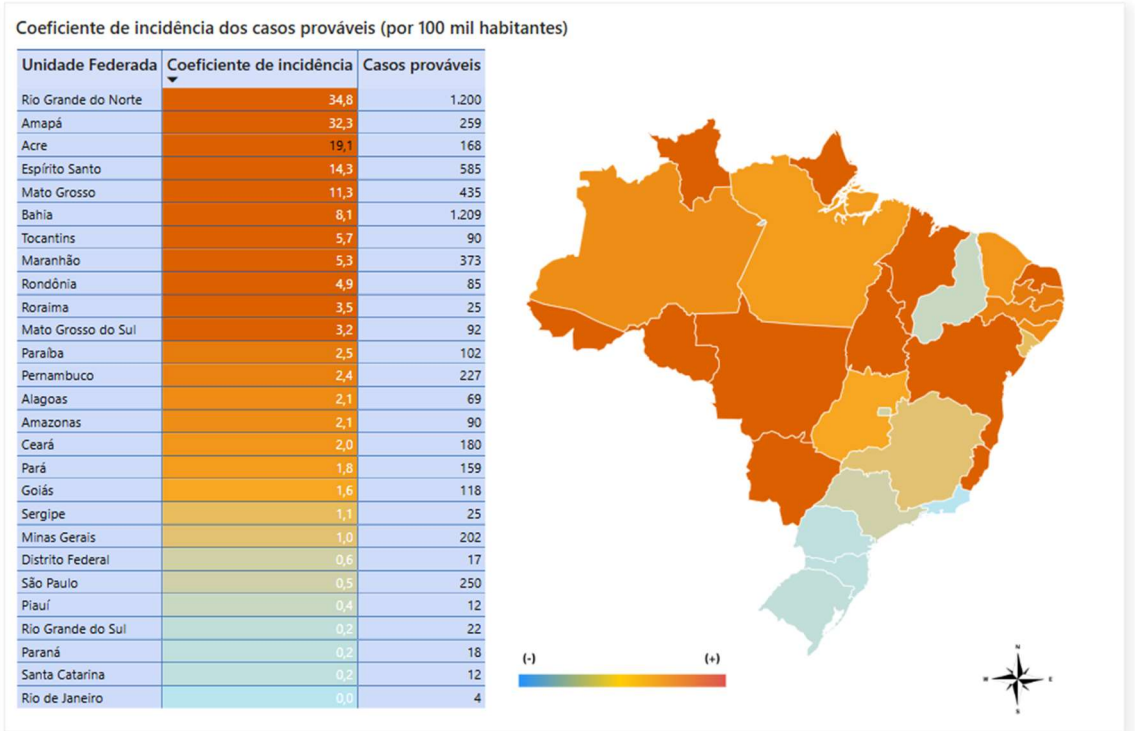


Figura 10. Casos prováveis e coeficiente de incidência por estado no Brasil em 2024. Fonte: Atualização de casos de arboviroses -Ministério da Saúde

O ZIKV está associado a uma gama de quadros clínicos que vão desde a presença de sintomas leves, como febre e dor de cabeça, até sintomas potencialmente debilitantes, como dores nas articulações, astenia e arreflexia (DE LAVAL et al., 2018).

Além disso, a infecção no primeiro trimestre de gravidez com o ZIKV está associada a graves alterações estruturais neurológicas. A síndrome da Zika congênita (SZC) engloba

microcefalia severa, desproporções craniofaciais, anormalidades auditivas e oculares, calcificações subcorticais. Essas alterações estruturais implicam mudanças cognitivas e comportamentais, como um aumento de reflexos primitivos, hiperexcitabilidade, hiperirritabilidade e deficiências intelectuais (DE AMORIN VILHARBA et al., 2023; MASSETTI et al., 2020; WHEELER et al., 2020).

O tropismo pelo SNC é evidenciado não somente durante o desenvolvimento, mas também em adultos. O ZIKV é capaz de infectar diferentes tipos celulares do sistema nervoso central, como astrócitos, micróglias, progenitores neuronais e neurônios maduros (HAMMACK et al., 2019; LEDUR et al., 2020; MANET et al., 2022; OLIVEIRA, F. B. C. de et al., 2023). Em modelos *in vivo*, essa infecção se correlaciona com uma intensa resposta inflamatória, uma alteração da comunicação neuro-glial hipocampal e mudanças cognitivas e comportamentais (BOBERMIN et al., 2020; RAPER et al., 2020).

1.5. Orthoflavivírus e o metabolismo lipídico

Durante a infecção viral, a maquinaria celular do hospedeiro é sequestrada, impactando vias essenciais, como a síntese de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, de modo a facilitar diferentes etapas do ciclo viral. Em múltiplas infecções virais, o metabolismo lipídico desempenha um papel crucial, e sua importância tem sido progressivamente elucidada, especialmente no contexto dos vírus pertencentes ao gênero *Orthoflavivirus*. Estudos indicam que aproximadamente 15% dos lipídios são modulados durante a infecção pelo DENV em células de mosquito, enquanto cerca de 33% dos lipídios apresentam aumento na infecção pelo WNV em células de mamíferos (Martín-Acebes et al., 2014; Perera et al., 2012). Em modelos de mamíferos *in vitro*, a proteína NS3 do DENV induz a expressão da ácido graxo sintase (FASN) e promove sua redistribuição para sítios de replicação viral (HEATON et al., 2010). Em relação ao ZIKV, sua infecção leva à elevação de lipídios, incluindo triglicerídeos e lisofosfolipídios, logo após as primeiras doze horas de infecção, em um modelo de células hepáticas humanas (HEHNER et al., 2024). Esses achados sugerem que as alterações no metabolismo lipídico são relevantes mesmo entre organismos evolutivamente distintos.

1.6. Colesterol: modulações e papéis em infecções virais.

Além da relevância geral do metabolismo lipídico, o colesterol, em particular, desempenha um papel fundamental no curso das infecções por Orthoflavivírus. Durante a infecção, seu aumento ou captação ocorre de forma espontânea, enquanto respostas antivirais estão associadas à supressão da sua síntese. É observado que, durante a infecção por ZIKV, há um excepcional aumento da expressão de genes relacionados à síntese de ácidos graxos e de colesterol, via modulação de SREBP2 (BRANCHE et al., 2022). No caso da infecção com o DENV, foi relatado um aumento da captação de colesterol via lipoproteínas e uma maior atividade da HMGCR (SOTO-ACOSTA et al., 2013). Já quanto ao WNV, a infecção leva à indução da síntese de colesterol, com um aumento de até cinco vezes na expressão de HMGCR em sítios de replicação viral. Além disso, a inibição da síntese de colesterol comprometeu a replicação viral. Adicionalmente, foi demonstrado que a manipulação dos níveis intracelulares de colesterol durante a infecção pelo WNV pode influenciar a resposta antiviral desencadeada pela via de interferon (MACKENZIE; KHROMYKH; PARTON, 2007). Esses achados reforçam a relevância do metabolismo lipídico e, especialmente, do colesterol, no contexto da infecção por Orthoflavivírus, destacando-o como um potencial alvo para novas abordagens terapêuticas.

Esteróis, como o ergosterol em fungos, fitosterol em plantas e o colesterol em animais, são moléculas características de seres eucarióticos. A síntese de colesterol requer oxigênio e uma série de evidências apontam que o colesterol surge como uma adaptação a ambientes ricos em oxigênio, reduzindo a difusão deste pela membrana (BROWN; GALEA, 2010).

O colesterol é um dos componentes da membrana plasmática de animais, tendo papel na fluidez, sendo também o precursor de hormônios esteroidais e vitaminas (CORTES et al., 2014). O enriquecimento de colesterol na membrana leva à formação de regiões ordenadas e mais estáveis, contrastando com regiões desordenadas e fluidas do resto da membrana. Essas regiões são denominadas balsas ou jangadas lipídicas (*lipid rafts*, do inglês). Elas oferecem uma região estável favorável à clusterização de receptores sendo, portanto, chave em inúmeros processos celulares, envolvendo sinalização, respostas

imunes e também influenciam a entrada de patógenos e o brotamento viral (Figura 11) (SEZGIN et al., 2017).

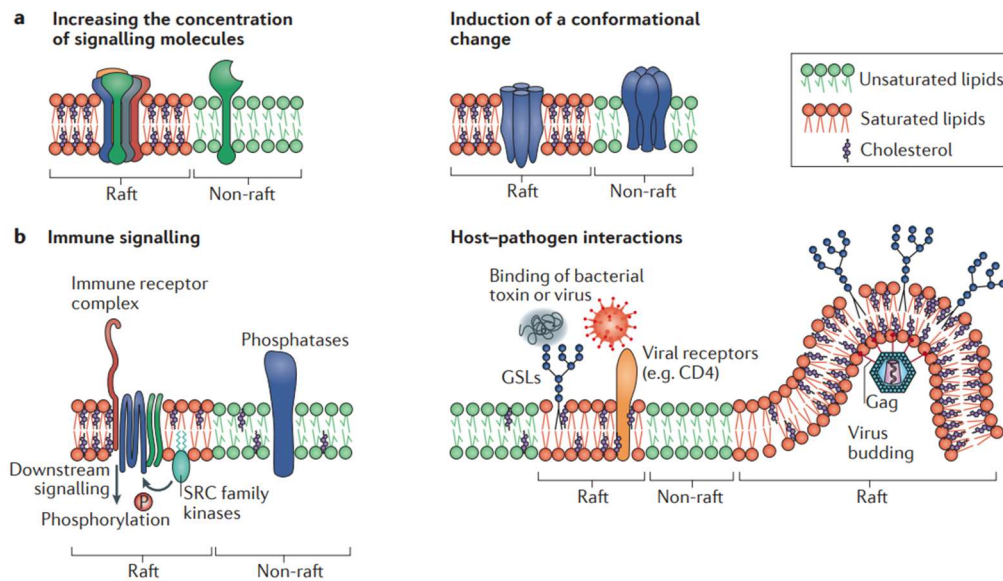


Figura 11. Processos celulares influenciados por jangadas lipídicas. Fonte: (SEZGIN et al., 2017)

Adicionalmente, o colesterol possui papéis importantes em tráfegos de vesículas e é um componente importante em alguns vírus envelopados (TIFFANY; BLOUGH, 1970; ZHANG, J. et al., 2009). Considerando os diferentes papéis do colesterol, algumas vertentes sugerem que este teve um papel fundamental na evolução de seres multicelulares (MOURITSEN; ZUCKERMANN, 2004).

A necessidade do colesterol durante a infecção é observada não somente em estágios iniciais, mas também em estágios tardios da infecção. Em estágios iniciais do ciclo viral, uma redução de colesterol na membrana, via metil- β -ciclodextrina (M β CD), leva a uma redução da entrada de Orthoflavivírus, incluindo o vírus da encefalite japonesa (JEV), DENV e WNV, provavelmente devido a ruptura de jangadas lipídicas. Além disso, a adição de colesterol foi suficiente para reverter esse fenômeno (LEE, C.-J. et al., 2008a; MEDIGESHI et al., 2008).

Em modelos de membranas artificiais, a fusão do WNV foi impactada não apenas pela acidificação, mas também pela presença de colesterol, cuja ausência impediu esse processo, sugerindo um papel essencial desse lipídeo na liberação do genoma viral (MOESKER et al., 2010).

Durante a replicação, a formação de compartimentos membranosos ocorre a partir do brotamento da membrana do retículo endoplasmático, e, na infecção pelo WNV, observa-se uma redistribuição de colesterol para esses sítios, acompanhada por um aumento da expressão de HMGCR, enzima chave da biossíntese do colesterol (MACKENZIE; KHROMYKH; PARTON, 2007). Os corpúsculos lipídicos, organelas que armazenam ésteres de colesterol e outros lipídios, são cooptados durante a replicação viral, e sua redução impacta diretamente a replicação do ZIKV (DIAS et al., 2023).

Além disso, a proteína prM do ZIKV contém domínios de ligação ao colesterol, cuja disrupção compromete não apenas a entrada do vírus na célula, mas também a montagem da partícula viral (GOELLNER et al., 2023). O vírus da hepatite C (HCV), pertencente da mesma família *Flaviviridae*, também apresenta sua montagem viral prejudicada pela redução na síntese de colesterol (LIEFHEBBER et al., 2014).

Por fim, nos estágios finais da infecção pelo HIV ou pelo vírus da influenza, a diminuição de jangadas lipídicas pode comprometer o brotamento de novas partículas virais (DICK et al., 2012; SCHEIFFELE et al., 1999). Portanto, não somente a entrada, mas a replicação, montagem e a liberação de partículas virais podem ser influenciadas pelo colesterol.

1.7. Colesterol e respostas antivirais

Enquanto há uma correlação entre infecções por Orthoflavivírus e um aumento da síntese de colesterol, respostas imune-inatas antivirais se correlacionam com uma redução de colesterol (Figura 12). Em macrófagos, uma resposta de interferon leva a uma redução da síntese, importação e um aumento da esterificação de colesterol, levando, portanto, a uma redução da biodisponibilidade de colesterol (ZHOU, Q. D. et al., 2020). A expressão da enzima colesterol-25-hidroxilase, que converte colesterol em 25-hidroxicolessterol, é induzida por interferon. Esse oxisterol se liga ao receptor LXR, levando a uma redução de colesterol. Adicionalmente, já foi demonstrado a capacidade antiviral de 25-hidroxicolessterol em relação ao ZIKV (LI, C. et al., 2017). Entre os genes induzidos por interferon está a proteína transmembranar induzida por interferon 3 (IFITM3), que se localiza em endossomas e impede a liberação do genoma viral aumentando a barreira energética do processo de fusão graças a um rearranjo do colesterol endossomal (KLEIN et al., 2023). A síntese de colesterol e as respostas de interferon estão tão intrinsecamente

relacionadas que, de modo inesperado, a redução da síntese de colesterol - espontaneamente - gera uma resposta de interferon (NISHIMURA et al., 2024; YORK et al., 2015). Portanto, aparentemente, evolutivamente a natureza desenvolveu de modo elegante uma via dialética entre colesterol e interferon dando origem a um circuito imunometabólico.

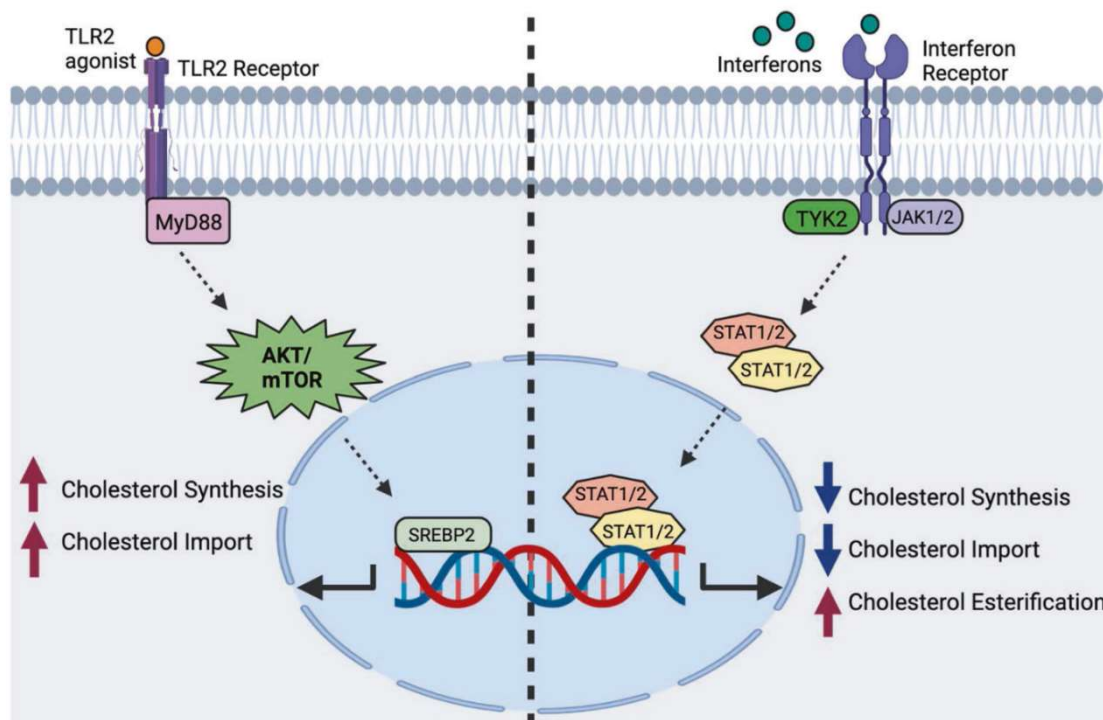


Figura 12. Impacto da via de interferon no metabolismo de colesterol. Fonte: (LEE, M. S.; BENSINGER, 2022)

2. Justificativa

As estatinas estão entre os fármacos mais utilizados mundialmente, e seu uso tem aumentado ao longo dos anos, provavelmente impulsionado pelo crescimento da obesidade e do diabetes, fatores que contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BLAIS et al., 2021b; PHELPS et al., 2024; ZHOU, B. et al., 2024). Dentre os efeitos adversos relatados, destacam-se aqueles relacionados ao sistema nervoso central, como cefaleia, alterações cognitivas e distúrbios do sono, ainda sem uma explicação satisfatória. Estatinas lipofílicas estão mais associadas a efeitos cognitivos, e, no Brasil, a grande maioria dos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) fazem uso desse tipo de estatinas, com mais de 90% desses pacientes sendo tratados com sinvastatina (MACEDO, 2018; SAHEBZAMANI et al., 2014). Apesar de sua eficácia, observa-se uma alta taxa de descontinuação do tratamento, onde esses, pacientes pode migrar para terapias menos eficientes, ou pior, terapia alguma. Com isso, esses pacientes estão mais

propensos a desenvolverem doenças cardiovasculares, se colocando em risco de implicações debilitantes e letais. Ressaltando a importância desse tratamento, o impacto econômico do tratamento de doenças cardiovasculares ao SUS é significativo, alcançando cerca de R\$1 bilhão ao ano (DE OLIVEIRA, G. M. M. et al., 2024). Além de fundamentar as bases moleculares desses efeitos, esse conhecimento poderia contribuir para a tomada de decisão clínica, além de contribuir para o desenvolvimento de futuros fármacos.

Os Orthoflavivírus têm grande relevância sanitária, impactando significativamente os sistemas de saúde, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Com o aumento da temperatura média global, em decorrência de ações antrópicas, novas áreas se tornam habitáveis ao vetor, intensificando a preocupação com o surgimento de novas epidemias (DEICHSTETTER, 2017). O ZIKV continua sendo uma ameaça relevante, especialmente devido às complicações associadas à síndrome congênita do Zika, que geram impactos duradouros para as famílias afetadas. Além disso, evidências crescentes indicam uma relação entre infecções pré-natais e alterações cognitivas e comportamentais (SHI et al., 2003). O custo estimado das infecções por Orthoflavivírus para os cofres públicos podem ultrapassar R\$ 28 bilhões (VANCINI; ANDRADE; DE LIRA, 2024). Até o momento, não há vacinas aprovadas por órgãos reguladores especificamente para o ZIKV, o que reforça a necessidade de novas abordagens. Ademais, a manipulação do metabolismo lipídico, especialmente do colesterol, é um mecanismo evolutivamente conservado entre diferentes Orthoflavivírus. Dessa forma, uma compreensão mais aprofundada do papel do colesterol na replicação do ZIKV pode não apenas contribuir para o entendimento do ciclo viral e de suas estratégias metabólicas, mas também fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas abordagens antivirais.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral:

Avaliar os efeitos de diferentes estatinas sobre micróglias e neurônios, bem como sobre a resposta à infecção pelo vírus Zika.

3.2. Objetivos específicos:

- Averiguar o impacto de diferentes tipos de estatinas em parâmetros de viabilidade, estresse oxidativo e ativação celular.
- Mensurar o perfil inflamatório induzido por diferentes tipos de estatinas em células microgliais.
- Tipificar a morte celular induzida por diferentes estatinas em células microgliais.
- Avaliar a citotoxicidade de estatinas em neurônios.
- Verificar se o colesterol e outros produtos da via do mevalonato são modulados na infecção microglial com o ZIKV.
- Examinar se redução da síntese do colesterol, via estatinas, contribui para redução de parâmetros de danos e estresse oxidativo durante a infecção microglial com o ZIKV.
- Identificar se a redução da síntese de colesterol, via estatina, contribui para uma redução da carga viral do ZIKV em micróglia.

4. Metodologia

4.1. Cultura de células

Células Vero, derivadas de células epiteliais renais do organismo *Cercopithecus aethiops*, foram cultivadas em meio DMEM (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nova Biotecnologia) e 1% de penicilina/estreptomicina (GIBCO), e cultivadas em estufa a 37°C e 5% CO₂.

Células C6/36, originárias de larvas de mosquito *Aedes albopictus*, foram cultivadas em meio TC100 suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina e incubadas a 28°C.

Células microgliais humanas C20, isoladas por (GARCIA-MESA et al., 2016), foram cultivadas em meio DMEM/F12 (1:1), suplementada em meio com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina e incubadas a 37°C e 5% de CO₂.

Células neuronais humanas SH-SY5Y foram cultivadas em meio DMEM/F12 (1:1), suplementada em meio com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina e incubadas a 37°C e 5% de CO₂.

4.2. Expansão viral

O isolado viral utilizado foi o ZIKV PE243 (GenBank: KX197192.1), que foi gentilmente cedido pelo professor Marcelo Brígido e seu aluno, Renato Kaylan. A propagação ocorreu a mediante a redução de SFB para 2% do volume de meio de cultura, atingimento de cerca de 70% de confluência celular e infecção usando a alíquota ZIKV PE243. Passados seis dias de infecção, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 4°C a 300G durante 5 minutos. Este foi então filtrado via filtro de 0,22 µm e congelado em -80 °C para posterior quantificação.

4.3. Titulação viral

Para a realização da titulação, $1,5 \times 10^5$ células por poço foram plaqueadas utilizando meio DMEM suplementado com 2% de SFB, e em placas de 24 poços. No dia seguinte, sete diluições seriadas da alíquota viral foram feitas, em meio DMEM sem SFB, e então 200µL foi adicionado às respectivas triplicatas. Passada uma hora, os meios foram absorvidos, lavados com PBS, e adicionou-se 1mL de meio semissólido contendo DMEM + carboximetilcelulose 1,5% (Sigma). A placa foi incubada por 6 dias, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Retirou-se o meio semissólido, lavou-se 3 vezes com PBS e adicionou-se 400µL de formaldeído 10% por uma hora. Foi retirado o fixador, lavou-se os poços com água, e foi adicionado cristal violeta 0,2% durante 1 hora. Descartou-se o líquido, lavou-se com água e foi deixado secar para que fosse realizada a contagem dos *spots*. A média aritmética de *spots* entre as triplicatas foi inserida na fórmula $P \times F \times D = (\text{PFU/ml})$, sendo P a média do número de *spots*, F o fator de correção (1000µl / volume do inóculo), e D o fator de diluição viral de onde os *spots* foram formados.

4.4. Condições experimentais

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas três estatinas: sinvastatina, rosuvastatina e pitavastatina. A sinvastatina e a pitavastatina são estatinas lipofílicas, de segunda e terceira geração, respectivamente, enquanto a rosuvastatina é uma estatina hidrofílica de terceira geração. As concentrações utilizadas variaram entre 1 μ M, 5 μ M e 25 μ M, e, para as condições veículo, foram calculadas as concentrações equivalentes de DMSO: 0,005%; 0,025% e 0,125% (v/v). As estatinas sinvastatina, rosuvastatina cálcica e pitavastatina cálcica foram obtidas em farmácia de manipulação (Volta à Natureza) e atestavam grau de pureza > 99%.

Nos experimentos **sem** infecção com o ZIKV, no dia seguinte ao plaqueamento, foram preparadas soluções com as respectivas concentrações de estatinas a partir de um estoque 20 mM em DMSO. Estas soluções foram feitas com DMEM/F12 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Após o preparo das soluções, o meio de cultura dos poços foi aspirado e substituído pelo meio das respectivas condições. As células foram então incubadas a 37°C, 5% CO₂ pelos tempos de estímulo estabelecidos.

Para os experimentos **com** infecção pelo ZIKV, no dia seguinte ao plaqueamento, as soluções para tratamento foram preparadas com DMEM/F12 suplementado com 2% de SFB. Após o preparo das soluções, o meio de cultura dos poços foi aspirado e substituído pelo meio contendo estatinas ou veículo. As células foram incubadas por uma hora a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi removido e adicionou-se meio contendo ZIKV (MOI 1 ou 10) com estatinas nas condições estabelecidas (Figura 13).

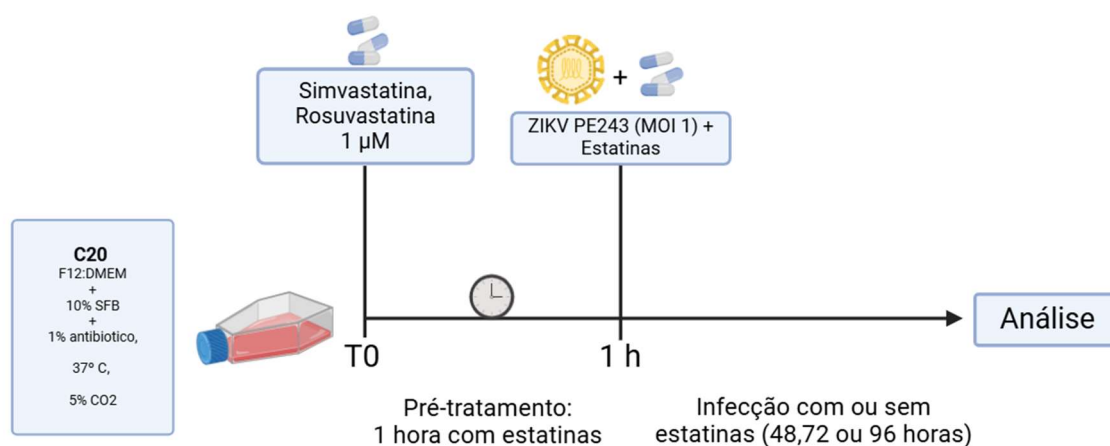


Figura 13. Condições de cultivo celular e forma de realização do estímulo envolvendo a infecção com o ZIKV. Criado via Biorender.

4.5. Diferenciação para a obtenção de neurônios maduros

Para a diferenciação das células de neuroblastoma SH-SY5Y, foi feito o coating da placa com colágeno IV (Thermo Fisher) por uma hora e, em seguida, o plaqueamento de 5×10^4 células em placa de 96 poços. No dia seguinte, foi adicionado uma solução de DMEM/F12 Glutamax (GIBCO), 15% SFB e ácido retinóico $10 \mu\text{M}$. Após dois dias, uma nova adição dessa solução foi feita. Passados mais 2 dias, adicionou-se uma solução de DMEM contendo 50 ng/mL BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor, Invitrogen). No dia seguinte foram feitos os estímulos para os respectivos experimentos.

4.6. Análise da viabilidade Mitocondrial

Quanto a linhagem C20, ou $6,5 \times 10^3$ células foram plaqueadas, em número amostral igual a cinco, para 24h ou 48h, respectivamente. Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato. Passado o tempo de estímulo, foi preparado uma solução de meio de cultura contendo $0,5 \text{ mg/mL}$ de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Thermo fisher). O meio foi aspirado e a solução de MTT foi adicionada. Incubou-se as células por uma hora à 37°C , 5% CO_2 , protegidas da luz. A redução do MTT devido a ação de desidrogenases mitocondriais foi mensurada mediante conversão de MTT à formazan, solubilização em DMSO e medição de absorbância em 570 nm , utilizando o espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices). Para a análise, foi usada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \left(\frac{ABS_{570}}{\text{Média do não estimulado}} \right) \times 100$$

4.7. Tipificação da morte celular via ensaio de Anexina V e Iodeto de Propídio (PI)

As células foram plaqueadas em placas de 24 ou 12 poços, em número amostral igual a três, exceto quando enunciado o contrário. Após o tempo de estímulo, o sobrenadante de cada poço foi individualmente coletado e transferido para *eppendorfs* etiquetados. Em seguida, os poços foram lavados com PBS, adicionou-se tripsina (SAFC) + EDTA 0,25% (GIBCO), e as células foram incubadas em estufa a 37°C, 5% CO₂, por 5 minutos. Após esse período, a tripsina foi neutralizada com meio de cultura contendo 10% de SFB, e o conteúdo dos poços foi transferido para os respectivos *eppendorfs*, que foram centrifugados por 5 minutos a 140 G. O sobrenadante foi descartado e realizou-se uma nova etapa de lavagem com PBS, seguida de centrifugação. Os controles positivos foram fervidos durante 15 minutos e depois mantidos no gelo por 5 minutos. Adicionou-se 50 µL de solução de Anexina V 1:20 (Thermo fisher) e PI 1:40 (quatroG Biotecnologia) em *binding buffer*, exceto na condição “Não marcado”, onde somente 100 µL de *binding buffer* foram adicionados, ou nas condições “Anexina positivas” e “PI positivas”, onde foram adicionados apenas 50 µL de *binding buffer* e 50 µL dos respectivos fluoróforos. As amostras foram marcadas por 15 minutos, protegidas da luz. Após a marcação, adicionou-se 400 µL de *binding buffer*, e a leitura foi realizada imediatamente no citômetro de fluxo BD Accuri C6 ou BD FACSVerse, em canais FL-1 e FL-3. A análise dos dados se deu no Software FlowJo (Versão 10), onde houve compensação e cálculo da média geométrica para a obtenção da intensidade de fluorescência média (MFI) e porcentagem de células em cada quadrante, para posterior análise estatística.

4.8. Avaliação da liberação de LDH

Quanto a linhagem de micróglia, foram plaqueadas 10⁴ ou 6,5 x 10³ células por poço, em número amostral igual a três, para 24h ou 48h, respectivamente. Para esse experimento, foi utilizado o kit *CyQuant LDH cytotoxicity assay - Invitrogen*. Foi adicionado *lysis buffer* no controle positivo 30 minutos antes do experimento começar. Após esse período, 50 µL de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços. Adicionou-se 50 µL de solução contendo *substrate mix* e 5% *assay buffer* (v:v) a cada poço, então incubou-se a placa por 30 minutos, protegida da luz e em temperatura ambiente. Foi adicionado 50 µL de *stop solution* em cada poço. Antes da leitura realizou-se a retirada de qualquer bolha. A redução de sal de tretazólio à formazam foi obtida via

mensuração da absorbância em 490 e 680 nm em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices). Para a análise, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Liberação de LDH} = \left(\frac{ABS_{490} - ABS_{680}}{\text{Média da liberação máxima}} \right) \times 100$$

4.9. Ensaio cinético de medição da formação de poros na membrana

Para a análise cinética de formação de poros na membrana, $1,7 \times 10^4$ células por poço foram plaqueadas em placa de 96 poços, preta, de fundo chato. No dia seguinte em meio sem vermelho de fenol, contendo 6 µg/mL de PI e 20mM de HEPES, foram feitos os estímulos. Imediatamente após o término, foi iniciada a leitura fluorimétrica, em comprimento de excitação igual a 538 nm e de 617 nm de emissão. Como controle positivo foi utilizado triton 0,5% em meio de cultura. A leitura ocorreu de uma em uma hora, durante 8 horas, no espectrofotômetro *SpectraMax M3*. Os dados obtidos foram analisados no *GraphPad Prism*.

4.10. Ensaio cinético da formação de espécies reativas de oxigênio

Foram plaqueadas $1,7 \times 10^4$ células por poço em placa de 96 poços preta, de fundo chato. No dia seguinte, removeu-se o meio de cultura dos poços e adicionou-se 50µL de solução de DCF-DA 4 mM (Sigma-Aldrich) em PBS por 45 minutos, a 37° C, 5% CO₂, protegido da luz. Após o tempo da marcação, todos os poços foram lavados duas vezes com PBS, e em seguida foram adicionados os estímulos em meio sem vermelho de fenol, e com 20mM de tampão HEPES. Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio 600 µM em meio de cultura. A partir disso, decorreu-se a leitura fluorimétrica em comprimento luminoso de excitação em 485 nm e emissão em 530 em espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices) durante 6 horas. As unidades relativas de fluorescência (RFU) foram utilizadas no posterior cálculo estatístico.

4.11. Ensaio da geração de espécies reativas de oxigênio por citometria.

A medição da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) se deu via utilização das sondas CellROX Green ou CellROX Deep Red (ThermoFisher). Células em densidade de $1,5 \times 10^4$ por poço foram semeadas, em placas de 24 poços, em número amostral por condição igual a três. Decorrido o tempo de estímulo, foi adicionado a sonda CellROX na concentração final de 5 mM, diluída em meio de cultura, seguida de incubação a 37°C e 5% CO₂, protegida da luz, por 30 minutos. Retirou-se o meio e lavou-se 3 vezes com PBS. As células então foram desaderidas com tripsina, via incubação por 5 minutos a 37° e 5% CO₂, seguido de inativação com meio de cultura com 10% de SFB, centrifugação a 140G por 5 minutos, lavagem com PBS, centrifugação a 140G por 5 minutos e leitura. A leitura foi feita em citômetro de fluxo BD FACSVerse, em canais FITC e PE, para o CellROX Green e CellROX Deep Red, respectivamente. A análise dos dados se deu no Software FlowJo (10), onde foi selecionada a população viável com base em parâmetros de tamanho e granulosidade. Em seguida, assumindo uma relação linear entre FSC-H e FSC-A, foi realizada a remoção de *doublets* (Figura 14), com posterior cálculo da média geométrica para a obtenção da intensidade de fluorescência média (MFI) para posterior análise estatística no software *GraphPad Prism*.

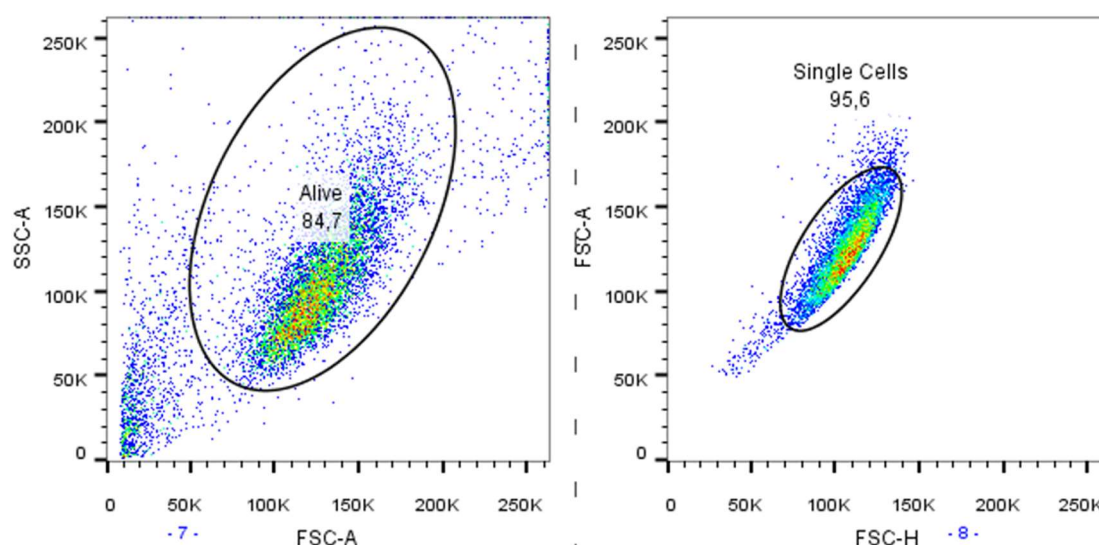


Figura 14. Estratégia de gate em citometria de fluxo para células viáveis e singlets, com o objetivo de analisar a geração de espécies reativas de oxigênio.

4.12. ELISA

A análise do perfil de secreção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α pelas células C20 estimuladas com estatinas foi realizada a partir do ensaio de ELISA, utilizando Kits

comerciais (BD Biosciences). As células foram semeadas em placas de 24 poços, em número amostral por condição igual a três. No dia seguinte, as células foram estimuladas. Após o tempo de estímulo, os sobrenadantes das células foram coletados para dosagem das citocinas pelo método de ELISA de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente: adicionou-se o anticorpo de captura nos poços e a placa foi incubada a 4°C overnight. No dia seguinte, realizou-se o bloqueio e a adição das amostras e *standards*. Em seguida, adicionou-se o anticorpo de detecção e o reagente enzimático, seguido de TMB. Foram realizadas etapas de lavagem entre cada uma dessas fases. Por fim, adicionou-se *stop solution*. As amostras foram lidas no espectrofotômetro (Spectramax M3, Molecular Devices) no comprimento de onda de 450 nm. Os níveis de citocinas foram apresentados em níveis absolutos (pg/mL). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism.

4.13. Análise da biogênese de corpúsculo lipídico

Foi avaliada a biogênese de corpúsculo lipídico em 24h de estímulo. Para isso, $6,5 \times 10^4$ células foram semeadas em placas de 24 poços, de fundo chato, e estimuladas no dia seguinte. Terminado o tempo do estímulo, foi preparada uma solução contendo a sonda BODIPY (1:3000) em PBS, em local protegido da luz. Então, foram descartados os sobrenadantes de cada poço, adicionado a sonda e a placa foi incubada por 30 minutos, a 37°C e 5% CO₂, protegida da luz. Posteriormente, lavou-se os poços duas vezes com PBS, e então as células foram desaderidas, via tripsina + EDTA 0,25% por 5 minutos a 37°C e 5% CO₂. Meio de cultura contendo 10% de SFB foi utilizado como neutralizador da tripsina. Os conteúdos foram levados a eppendorfs etiquetados e centrifugados por 5 minutos a 140G. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se PBS e outra centrifugação nos mesmos parâmetros foi realizada. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se PFA 4%. A leitura foi feita, no mesmo dia ou, no máximo, em uma semana, em citômetro de fluxo BD Accuri C6 no canal FL-1. A análise dos dados se deu no Software FlowJo (Versão 10), onde foi selecionada a população viável, seguido de remoção de *doublets* e então cálculo da média geométrica para a obtenção da intensidade de fluorescência média (MFI) para posterior análise estatística no software *GraphPad Prism*.

4.14. Extração dos metabólitos e preparo das amostras

As células C20 foram plaqueadas em uma densidade celular de 5×10^4 células por poço, em placas de 6 poços. Para a extração dos metabólitos, após 48h de infecção e tratamento, as células foram desaderidas e transferidas para tubos *eppendorf*, nos quais foram adicionados 1000 μ l de metanol (Sigma-Aldrich) puro e 60 μ l de ribitol (0.1mg/ml). As amostras foram então incubadas a 4°C overnight e, após incubação, foram sonicadas à temperatura ambiente por 15 minutos, seguida de uma centrifugação a 10000g por 15min. Após esse processo, a fração aquosa superior contendo os metabólitos foi transferida para um novo tubo, separando-se do lisado celular contaminante, e direcionada para a próxima etapa experimental. As alíquotas foram secadas a vácuo e passaram pelo processo de derivatização, o qual foi realizado com uso de 40 μ l de cloridrato de metoxiamina 20mg/ml (Sigma-Aldrich) em piridina (Merck) e incubadas por 2h, a temperatura ambiente e agitação constante. Após essa etapa, foi adicionado MSTFA às amostras, as quais foram incubadas por 30 minutos a 37°C.

4.15. Perfil metabólico por GC/MS

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

4.16. Extração de RNA e Carga Viral

As células C20 foram plaqueadas em placas de 24 poços, em uma densidade celular de 7×10^4 células por poço. Após 48h de infecção, foi realizada a extração de RNA através do TRIzol™ Reagent, com base no protocolo disponibilizado pelo fabricante. Resumidamente, foi adicionado TRIzol, seguido de homogeneização, incubação, adição de clorofórmio, incubação e centrifugação durante 15 minutos à 12 000 g à 4°C. A fase aquosa contendo o RNA foi então transferida para novos tubos, onde foi adicionado isopropanol, seguido de incubação, centrifugação e descarte do sobrenadante. Ao precipitado, foi adicionado etanol e seguiu-se centrifugação e descarte do sobrenadante. O RNA foi eluído em de água livre de RNase. A concentração de RNA foi estimada usando 1µl de amostra, analisada no NanoDrop Microvolume Spectrophotometers (ThermoFisher Scientific)

Alíquotas contendo 1µg de RNA foram preparadas com 4 µL de master mix e 1µL de transcriptase reversa (do kit LightCycler 480 SYBR Green I Master e KitHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, respectivamente). 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. Para cada poço da placa de 384 poços, foram misturados 5 µL de master mix (ROCHE), 3,5 µL de água, 0,25 µL de primer *forward*, 0,25 µL de primer *reverse* e 1 µL de cDNA. As sequências dos primers utilizados foram as seguintes: para GAPDH, *forward* 5'-CGGGGCTCTCCAGAACATCATCC-3' e *reverse* 5'-CCAGCCCCAGCGTCAAAGGTG-3'; para ZIKV envelope, *forward* 5'-AAGTTTGCATGCTCCAAGAAAAT-3' e *reverse* 5'-CAGCATTATCCGGTACTCCAGAT-3'. 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 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.

4.17. Análise estatística

A verificação de normalidade se deu via visualização do gráfico de Q-Q plot. A homoscedasticidade foi averiguada por meio do teste de Levene. A análise de outliers se deu mediante ao teste Grubbs', com valor de $\alpha = 0,05$. Dados considerados normais e homocedásticos foram analisados mediante teste de hipótese ONE-WAY ou Two-Way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey para identificação das significâncias entre grupos. Dados considerados normais e com heterocedasticidade foram analisados via ANOVA de Welch, com pós-teste de Dunnett T3. Para dados não paramétricos, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis teste, seguido de pós-teste de Dunn's. Significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. Os softwares de análise estatística foram o GraphPad Prism (versão 8) e R (versão 4.4.2).

5. Resultados

5.1. Estatinas lipofílicas levam a uma maior redução de viabilidade do que a hidrofílica em micróglia humana.

Objetivando avaliar o impacto de diferentes estatinas em células microgliciais, tratamos células C20 por 24 (Figura 15) ou 48 horas (Figura 16) e então a viabilidade mitocondrial foi mensurada. As estatinas utilizadas foram a sinvastatina e a pitavastatina, ambas lipofílicas e pertencentes à segunda e terceira geração, respectivamente, além da rosuvastatina, que é hidrofílica e de terceira geração.

Após 24 horas de exposição às estatinas, observamos que nas concentrações de 1 μM (Figura 15 A), a pitavastatina e a sinvastatina levaram a uma redução de viabilidade significativa em relação ao não tratado, ao veículo, e à rosuvastatina. Na concentração de

5 μ M (Figura 15 B), a sinvastatina e a pitavastatina reduziram a viabilidade significativamente tanto em relação ao não tratado, quanto em relação à rosuvastatina. Somente em 25 μ M (Figura 15 C) a rosuvastatina gerou uma perda de viabilidade significativa em relação ao não tratado, apesar dessa perda ter sido menor do que a induzida pela sinvastatina. Novamente, a sinvastatina e a pitavastatina geraram uma perda de viabilidade mitocondrial em relação ao não tratado nessa concentração.

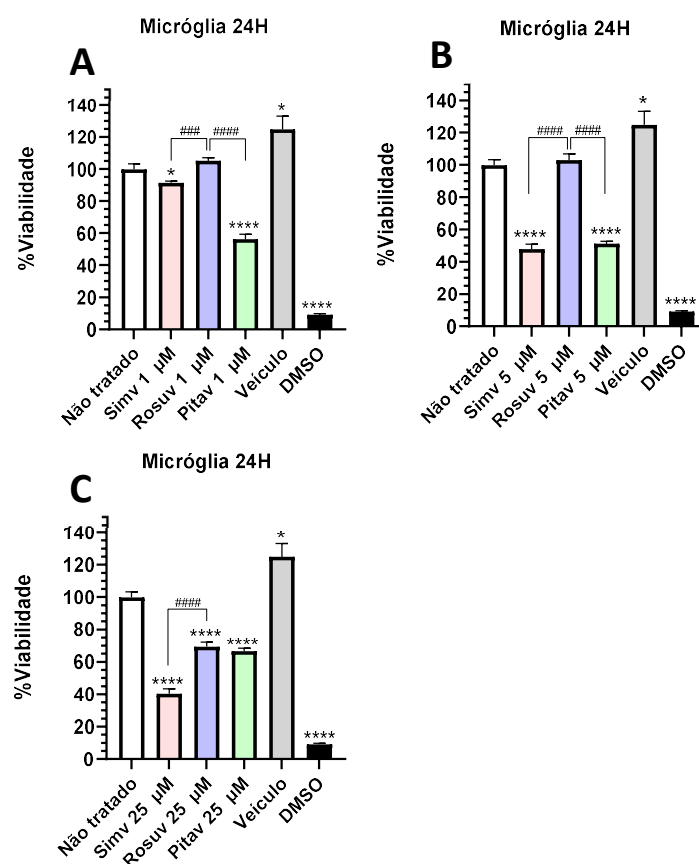


Figura 15. Células microglicais tratadas com diferentes estatinas durante 24h. Células C20 tratadas com sinvastatina, rosuvastatina ou pitavastatina, nas concentrações 1 μ M (A), 5 μ M (B) ou 25 μ M (C). A viabilidade mitocondrial foi averiguada mediante a mensuração da redução de MTT. Veículo = DMSO 0,125% em meio de cultura. DMSO = dimetilsulfóxido 50%. Dados apresentam a média e desvio padrão de cinco poços por condição. O teste de hipótese escolhido foi a ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. Para significância estatística foram considerados valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparados com o não tratado ou $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####) entre grupos indicados.

Após 48 horas de tratamento, o fenômeno observado foi semelhante, mas uma perda de viabilidade maior foi constatada. Nas concentrações de 1 μM (Figura 16 A), todas as estatinas levaram a uma perda de viabilidade mitocondrial em relação ao não tratado, entretanto, a redução causada pela rosuvastatina foi significativamente menor do que as demais estatinas. Na concentração de 5 μM (Figura 16 B), as estatinas lipofílicas, sinvastatina e pitavastatina, levaram a uma redução de viabilidade significativa em relação ao não tratado, induzindo uma diminuição desse parâmetro em mais de 80%. Também foi observado que apesar da rosuvastatina reduzir a viabilidade mitocondrial em relação ao não tratado, a perda de viabilidade era significativamente maior nas estatinas lipofílicas em relação à rosuvastatina. Em 25 μM (Figura 16 C), todas as estatinas levaram a uma grande redução da viabilidade, sendo a redução da sinvastatina significativamente maior do que a rosuvastatina.

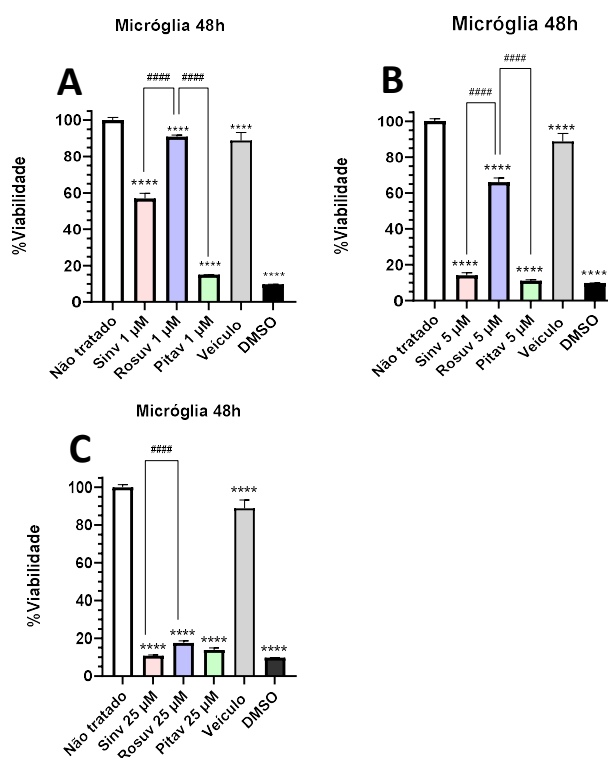


Figura 16. Células microgliais tratadas diferentes estatinas durante 48 horas. Células C20 tratadas com sinvastatina, rosuvastatina ou pitavastatina, nas concentrações 1 μM (A), 5 μM (B) ou 25 μM (C), durante 48 horas. A viabilidade mitocondrial foi averiguada mediante a mensuração da redução de MTT. Veículo = DMSO 0,125% em meio de cultura. DMSO = dimetilsulfóxido 50%. Dados apresentam a média e desvio padrão de cinco poços por condição. O teste de hipótese escolhido foi a ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. Para significância estatística foram considerados valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparados com o não tratado ou $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####) entre grupos indicados.

5.2. Estatinas levam à redução da biogênese de corpúsculo lipídico em micróglias humanas.

Em prosseguimento, buscamos avaliar parâmetros celulares e inflamatórios. O corpúsculo lipídico é uma organela com múltiplas funções descritas na literatura, indo além de um mero reservatório energético, estando também envolvido na produção de mediadores inflamatórios e sendo associado a processos de ativação celular (JARC, Eva; PETAN, 2020). A partir disso, o primeiro experimento dessa série foi a marcação de células microgliais com a sonda fluorescente Bodipy 493/503, 24 horas após a adição de estatinas, a fim de avaliar a biogênese de corpúsculo lipídico.

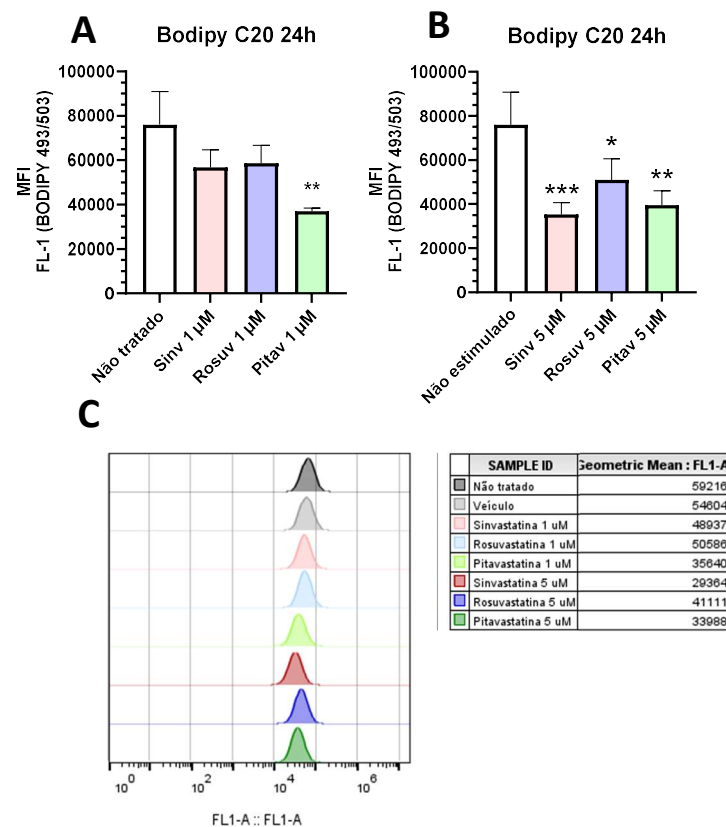


Figura 17. Análise da biogênese de corpúsculo lipídico em micróglias tratadas com estatinas. Células microgliais foram tratadas com diferentes estatinas nas concentrações de 1 μM (A) ou 5 μM (B) durante 24 horas. A biogênese dos corpúsculos lipídicos foi avaliada por marcação com a sonda fluorescente BODIPY 493/503. Replicatas foram escolhidas para ilustrar o fenômeno dos deslocamentos proporcionais à marcação com BODIPY 493/503 (C). Gráficos de barra mostram média e desvio padrão de 3 poços. O teste de hipótese escolhido foi a ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. Para significância estatística foram considerados valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparados com o não tratado ou $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####) entre grupos indicados.

Todas as estatinas levaram à redução significativa de corpúsculo lipídico na concentração de 5 μ M (Figura 17 B), quando comparadas ao não tratado. A pitavastatina foi a única que também levou a uma redução em 1 μ M (Figura 17 A). Não foram observadas diferenças significativas entre as estatinas quando comparadas na mesma concentração.

5.3. Estatinas não modulam a produção de espécies reativas de oxigênio em tempos iniciais em micróglias humanas.

A próxima etapa foi avaliar se a redução de viabilidade poderia envolver a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). É conhecido o envolvimento de ROS em processos de estresse, inflamação, combate a patógenos e morte celular. Além disso, em baixas concentração, ROS desempenham função sinalizadora de processos celulares homeostáticos (HEINKE, 2022). Dada a curta janela onde repostas oxidativas podem ocorrer, a geração de ROS foi monitorada durante 6 horas, logo após a adição de estatinas. A detecção de ROS se deu mediante a sonda DCFDA, que penetra na célula, sofre ação de esterases e pode ser oxidada por espécies reativas, emitindo um sinal fluorescente. Não foi observado um aumento significativo da geração de espécies reativas de oxigênio ao longo de 6 horas, em nenhuma das estatinas, e em nenhuma das concentrações (Figura 18).

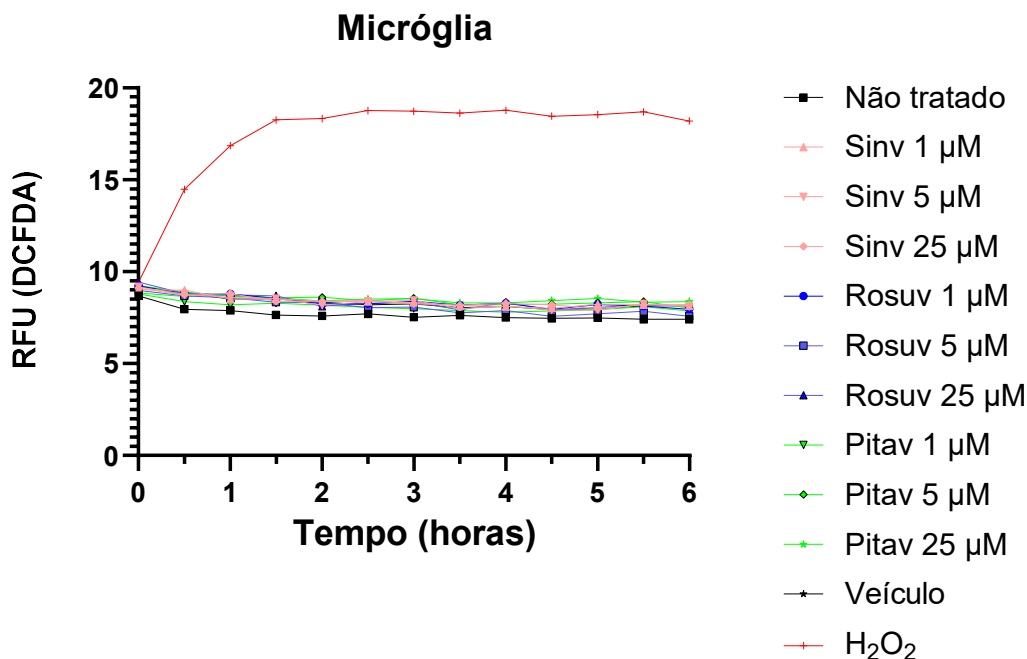


Figura 18. Produção de espécies reativas em células microgliais tratadas com estatinas. Células microgliais foram tratadas com diferentes concentrações de estatinas e então a produção de ROS foi medida durante as seis seguintes horas. Dados mostram médias de cinco poços em cada tempo. Veículo = DMSO 0,125% em meio de cultura. Positivo peróxido de hidrogênio 600µM. Dados apresentam a média de cinco poços por condição. O teste de hipótese escolhido foi a ANOVA two-way, com pós-teste de Tukey. Para significância estatística foram considerados valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparados com o não tratado ou $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####) entre os grupos indicados.

5.4. A pitavastatina leva a um perfil mais pró-inflamatório quando comparada à rosuvastatina em micróglia humanas.

A liberação de citocinas é um dos eventos primários em uma resposta imunológica, atuando como mediadoras desse processo ao propagar e amplificar o sinal inflamatório (RANKIN, 2004). Um processo inflamatório no sistema nervoso central pode acarretar alterações comportamentais e cognitivas, além de prejudicar o neurodesenvolvimento (ZIPP; BITTNER; SCHAFER, 2023). Vale ressaltar que, micróglia são as células que orquestram a inflamação no sistema nervoso central. A partir disso, a etapa seguinte consistiu em avaliar o padrão de secreção de citocinas de células microgliais após o tratamento com as diferentes estatinas durante 24 horas.

No que diz respeito à secreção da citocina IL-1 β , a pitavastatina 5 µM induziu um aumento significativo quando comparada à rosuvastatina 5 µM (Figura 19 A). A respeito da secreção da citocina TNF- α , a pitavastatina levou a um aumento significativo nas

concentrações de 1, 5 e 25 μM , tanto em relação ao não tratado quanto em comparação com as respectivas concentrações de rosuvastatina (Figura 19 B). Por fim, quanto à secreção de IL-6, a rosuvastatina 25 μM levou a uma redução significativa quando comparada ao não tratado (Figura 19 C).

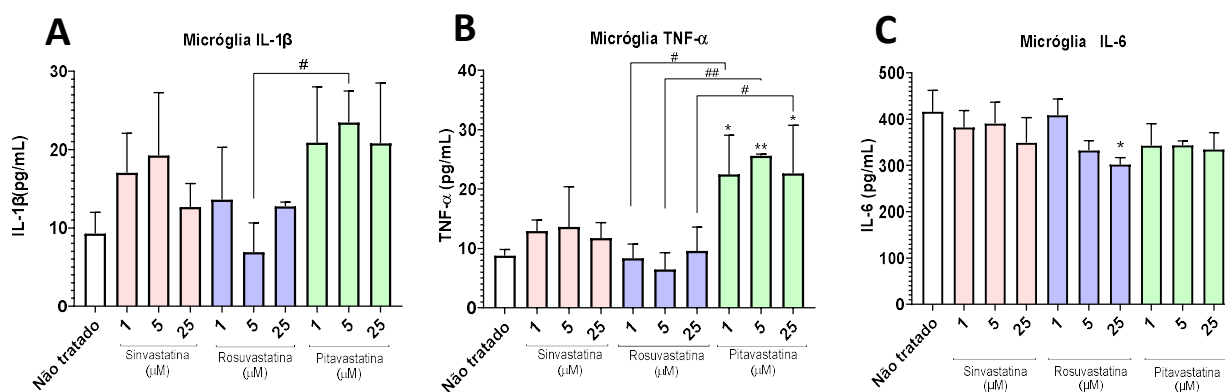


Figura 19. Análise da secreção de citocinas de células microgliais tratadas com estatinas. Após 24 horas de tratamento com estatinas, o sobrenadante de células C20 foi coletado para quantificação de IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-6 (C), mediante a técnica ELISA sanduíche. Dados apresentam a média e desvio padrão de três poços por condição. O teste de hipótese escolhido foi a ONE-WAY ANOVA, com pós-teste de Tukey. Para significância estatística foram considerados valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparados com o não tratado ou $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####) entre os grupos indicados.

5.5. Estatinas levam a um aumento de morte celular, especialmente apoptose, em micróglia humana.

Constatada a citotoxicidade, especialmente das estatinas lipofílicas, o próximo passo foi caracterizar o tipo de morte celular. Para isso, inicialmente mensuramos a captação de iodo de propídio para averiguar a presença de poros na membrana em tempos iniciais. Além disso, quantificamos a presença de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante como um parâmetro de citotoxicidade e perda de integridade da membrana. Por fim, marcamos células microgliais com anexina V e iodo de propídio (PI) para caracterizar e quantificar morte lítica e apoptótica.

Primeiramente, foi mensurada a captação de iodo de propídeo em células C20 a cada 30 minutos, durante as 8 primeiras horas de estímulo. Não foi observado aumento significativo para nenhuma das estatinas, independentemente da concentração, durante esse tempo inicial (Figura 20).

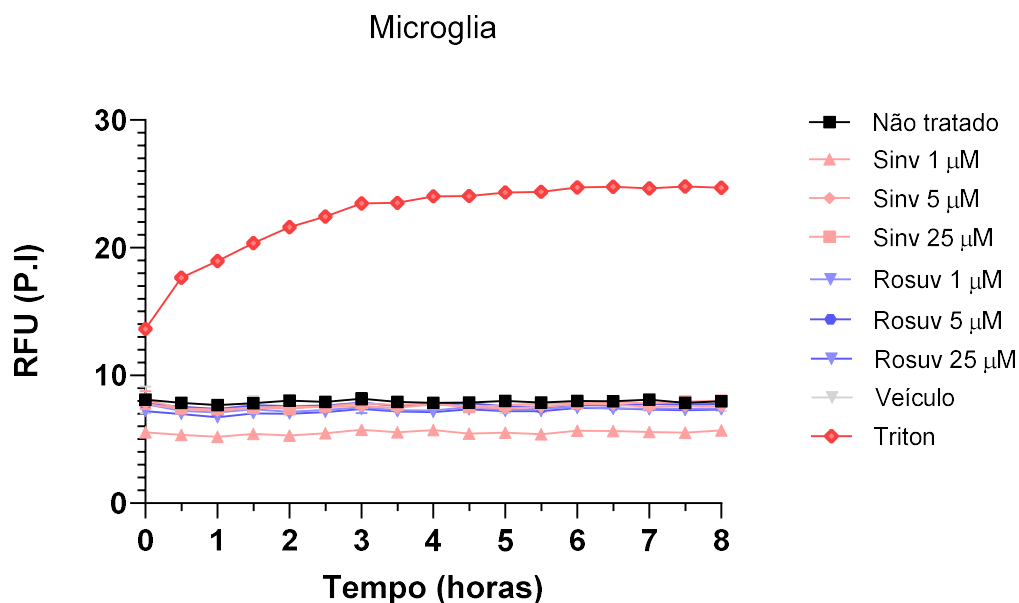


Figura 20. Ensaio de formação em células microglicais tratadas com estatinas. Junto ao estímulo, foi adicionado iodeto de propídio e averiguou-se a fluorescência cineticamente ao longo de 8 horas. Dados mostram média de 5 poços por condição em cada tempo. Veículo = DMSO 0,125%. Triton 0,5% foi utilizado como controle positivo. O teste de hipótese escolhido foi a ANOVA two-way, com pós-teste de Tukey, para comparação entre médias das condições em cada tempo. Para significância estatística foram considerados valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparados com o não tratado ou entre os grupos indicados.

Após 24h de estímulo, nenhuma das concentrações ou estatinas testadas modulou significativamente a liberação de LDH em relação ao grupo não tratado (Figura 21 A-C). Quando o estímulo perdurou 48 horas, na concentração de 1 µM (Figura 21 D), observou-se um aumento da liberação de LDH na presença de estatinas lipofílicas, em relação ao não tratado e à rosuvastatina. Na concentração de 5 µM, ambas as estatinas lipofílicas, sinvastatina e pitavastatina, levaram a um aumento significativo da liberação de LDH. Nessa concentração, a sinvastatina, mas não a pitavastatina, aumentou a liberação de LDH significativamente em relação à rosuvastatina (Figura 21 E). Em 25 µM (Figura 21 F) todas as estatinas levam a um aumento significativo em relação ao não tratado, mas não houve diferença entre as estatinas.

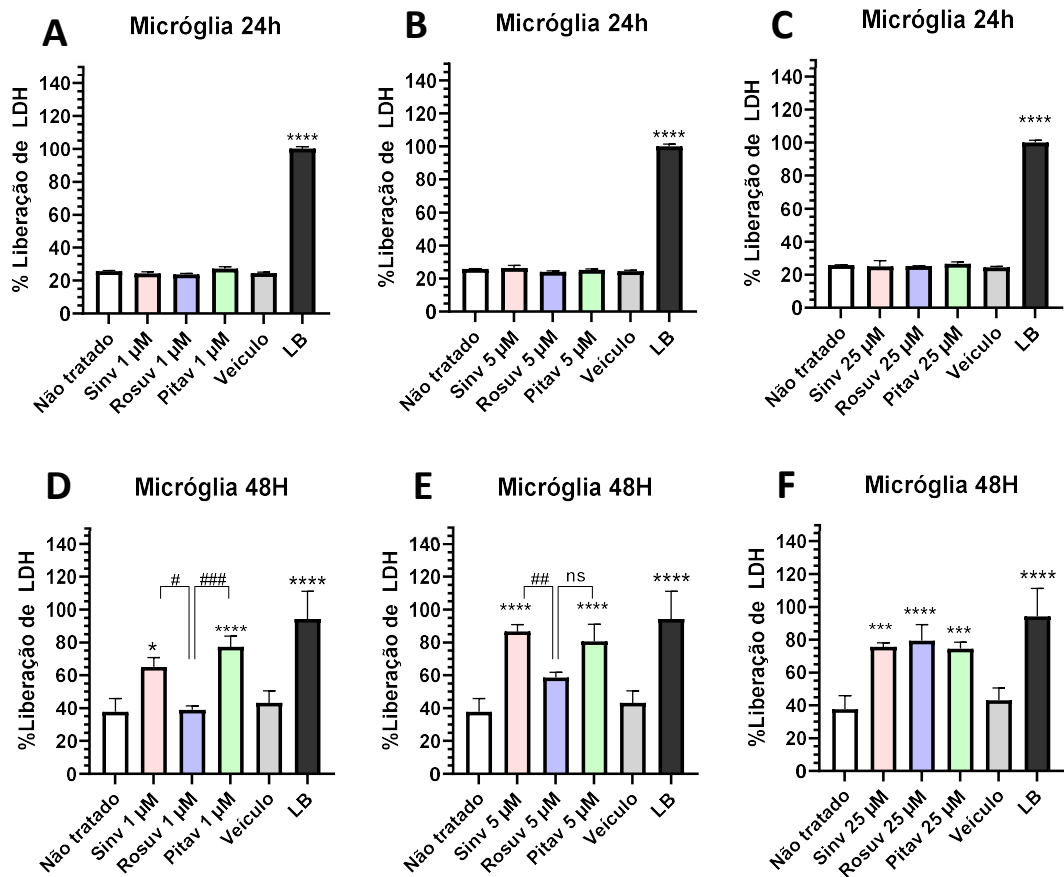


Figura 21. Liberação de LDH de células tratadas ou não com estatinas. Células microgliais foram estimuladas por 24 horas (A – C) ou 48 horas (D–F) com estatinas. Em seguida a liberação de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante foi mensurada. Dados mostram média mais desvio padrão de 3 poços. Veículo = DMSO 0,125%. LB = lysis buffer 1x. Como teste de hipótese, foi utilizada a ONE-WAY-ANOVA, com pós-teste de Tukey. Para significância estatística foram considerados valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparados com o não tratado ou $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####) entre os grupos indicados.

24h

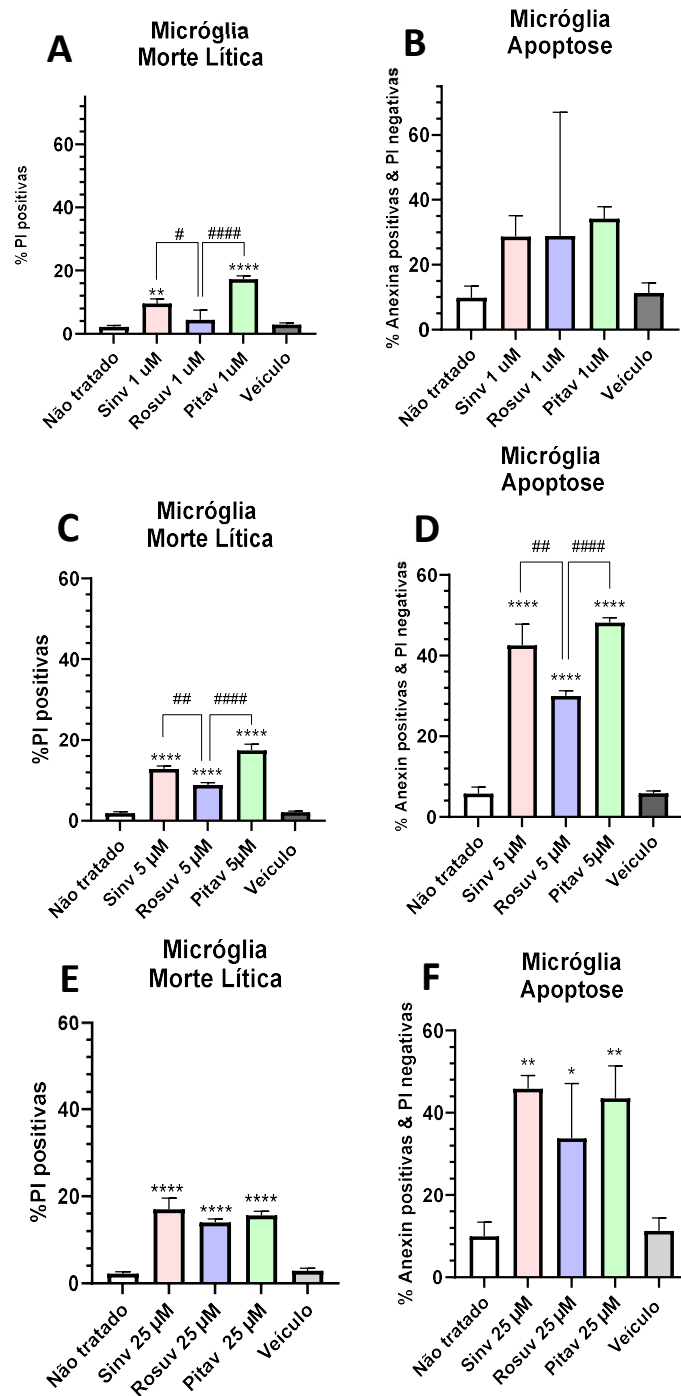
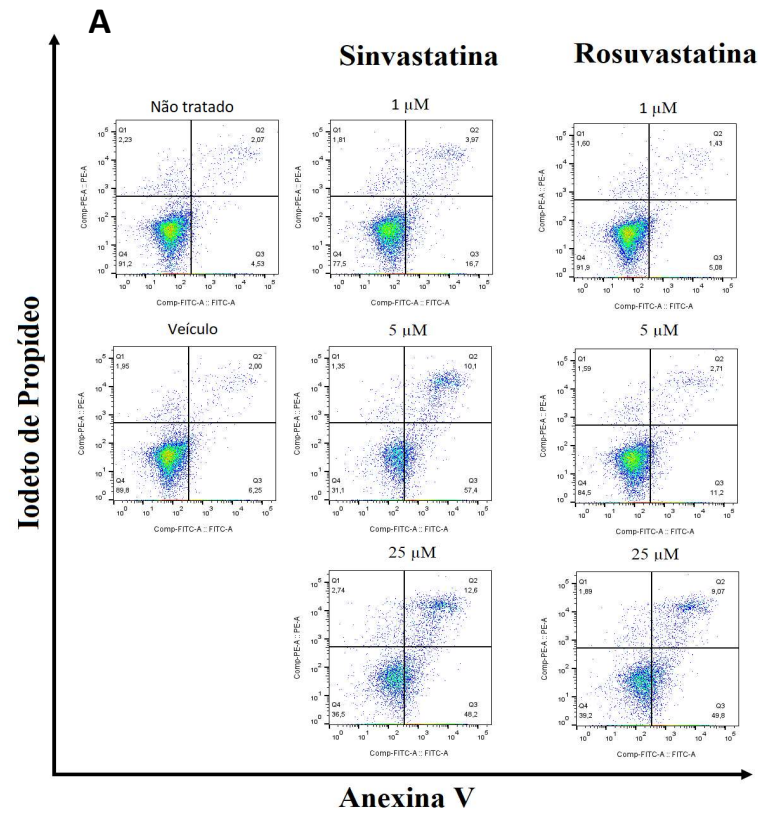


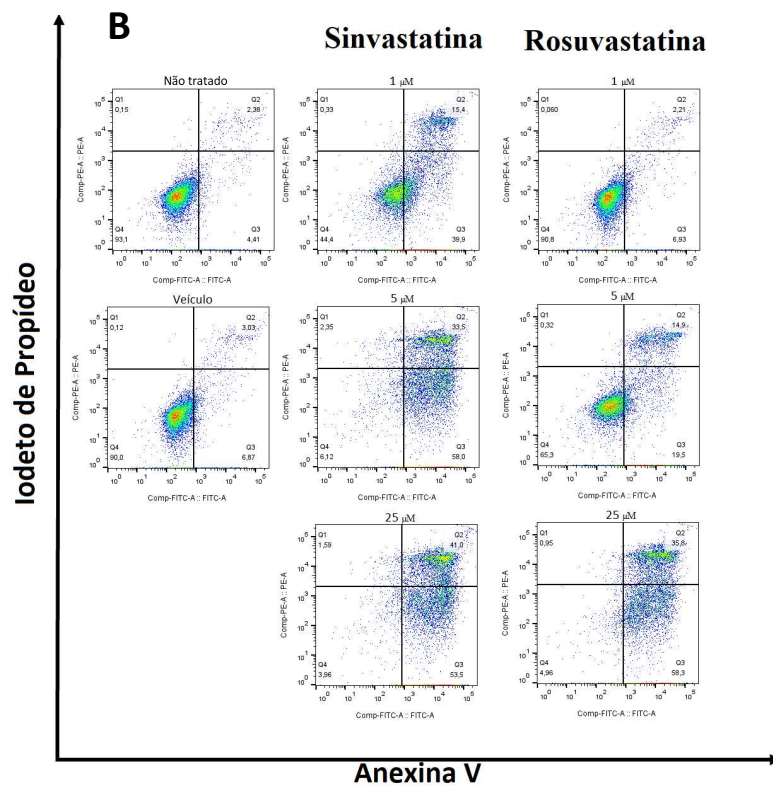
Figura 22. Tipificação da morte celular de micróglia tratadas com estatinas. Células C20 foram tratadas com estatinas durante 24 horas. A porcentagem de células positivas para iodeto de propídeo (PI) ou positivas para Anexina V e negativas para PI foi utilizada para o cálculo da morte lítica (A, C e E) e apoptótica (B, D e F), respectivamente. Gráficos de barras mostram médias mais desvio padrão de 3 poços. Veículo = DMSO 0,125%; 0,025% ou 0,005% para 25 μM, 5 μM ou 1 μM, respectivamente. Como teste de hipótese, foi utilizada a ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. Para significância estatística foram considerados valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparados com o não tratado ou $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####) entre os grupos indicados.

Quanto ao tipo de morte, esse foi diferenciado com base na marcação de células positivas para fosfatidilserina, via Anexina V, ou pela marcação de ácidos nucleicos, via iodeto de propídeo. Após 24 horas de estímulo na concentração de 1 μ M (Figuras 22 A, 22 B e 23 A), todas as estatinas levaram a um aumento de morte lítica em relação ao não tratado, sendo esse aumento menor na presença de rosuvastatina. Em 5 μ M (Figura 22 C, 22 D e 23 A), observa-se um aumento tanto da morte lítica quanto da apoptótica. Importante evidenciar a preponderância de morte apoptótica, que chegou a mais de 40% nas condições sinvastatina e pitavastatina 5 μ M. Além disso, a rosuvastatina demonstrou menor toxicidade, resultando em níveis inferiores de morte lítica e apoptótica em comparação à sinvastatina e pitavastatina. Em 24h de estímulo com 25 μ M (Figura 22 E, 22 F e 23 A), todas as estatinas levaram a um aumento significativo tanto de morte lítica quanto de morte apoptótica, sem apresentar diferenças significativas entre as diferentes estatinas. O padrão de morte apoptótica também foi predominante nessa concentração. Em tempos mais tardios, como 48h e 72h (Figura 23 A - D), observa-se um fenômeno semelhante ao de 24 horas, porém mais acentuado: um aumento de morte celular na estatina lipofílica em comparação com a hidrofílica, com predominância de morte celular apoptótica.

24h



48h



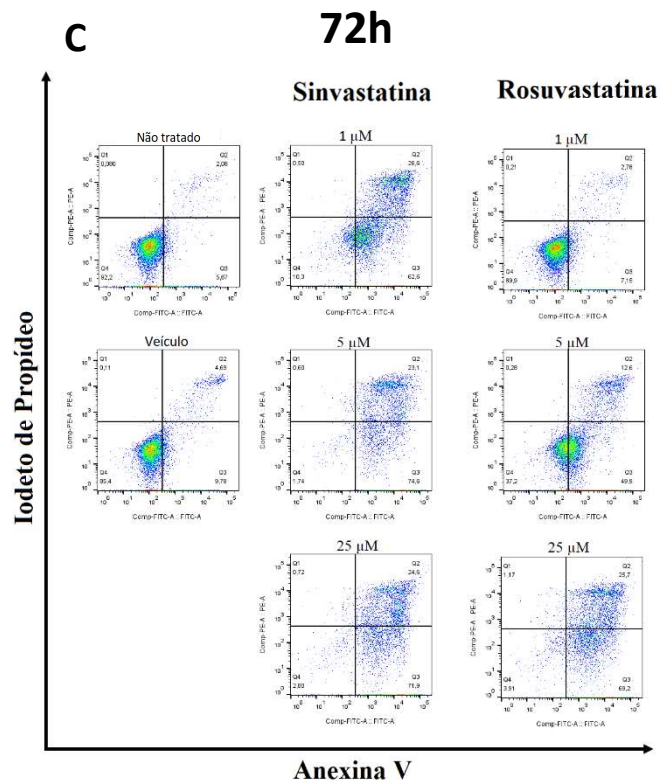


Figura 23. Tipificação da morte celular de células tratadas com estatinas. Células C20 foram tratadas com estatinas durante diferentes tempos. Dot Plots apresentam resultados das replicatas unitárias nos tempos de 24h (A), 48h (B) e 72h (C). Veículo = DMSO 0,125%.

5.6. Em neurônios, estatinas lipofílicas levam a uma maior citotoxicidade em comparação com a estatina hidrofílica.

Levando em consideração o impacto das estatinas em células microgliciais, a etapa seguinte consistiu em averiguar se um fenômeno semelhante poderia ocorrer e com qual intensidade em células neuronais. A fim de responder a essa pergunta, células de neuroblastoma SH-SY5Y foram diferenciadas de modo a apresentar características de um neurônio maduro. A partir disso, essas células foram estimuladas durante 24h ou 72h, e, em seguida, análises de viabilidade mitocondrial e de liberação de LDH foram realizadas.

Em relação à viabilidade mitocondrial, após 24h de tratamento, nenhuma alteração significativa foi observada em comparação com o grupo não tratado nas estatinas utilizadas (Figura 24 A -C). Em 72 horas de tratamento, considerando a concentração de 1 μ M (Figura 24 D), nenhuma modulação em relação ao não tratado foi significativa. Quanto à concentração de 5 μ M, somente a pitavastatina levou a uma redução em comparação ao não tratado, e essa redução também foi significativa em relação à rosuvastatina (Figura 24 E). Considerando a concentração de 25 μ M, no mesmo tempo, sinvastatina e pitavastatina causaram uma redução significativa na viabilidade em comparação ao grupo não tratado, sendo que a pitavastatina também causou uma redução significativa em relação à rosuvastatina (Figura 24 F).

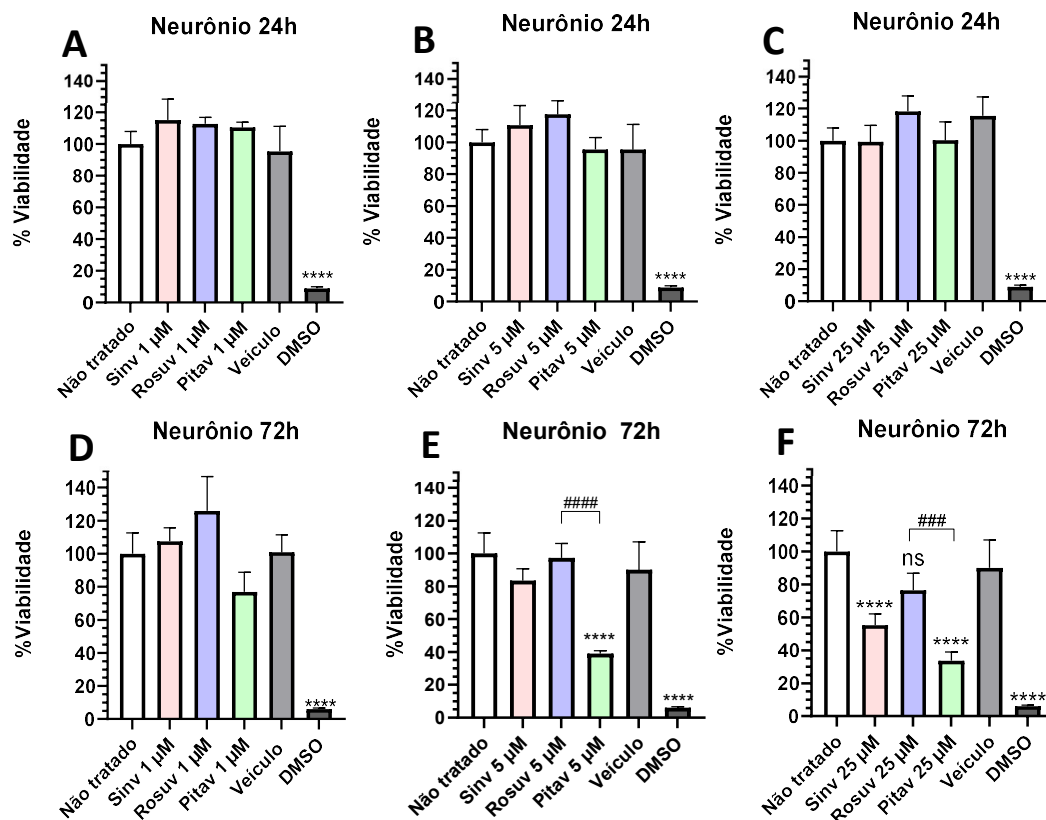


Figura 24. Viabilidade mitocondrial de neurônios tratados com estatinas. Células SH-SY5Y foram diferenciadas em neurônios maduros e em seguida foram estimuladas com diferentes estatinas durante 24 horas (A- C) ou 72 horas (D- F). Dados mostram média $\pm$ desvio padrão de 4 poços. Veículo = DMSO 0,125%, 0,025% ou 0,005%. Como teste de hipótese, foi utilizada a ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. Para significância estatística foi considerado valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparado com o não tratado ou $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####) entre grupos indicados.

Considerando a liberação de LDH, após 24h de tratamento com estatinas (Figura 25 A-C), nenhuma levou a uma modulação significativa. Após 72 horas de tratamento, observou-se um aumento na liberação de LDH apenas nas concentrações de 25 μ M de

sinvastatina e pitavastatina (Figura 25 F). Nessa concentração, a rosuvastatina não apresentou aumento significativo em relação ao grupo não tratado e teve uma liberação de LDH significativamente menor em comparação à sinvastatina (Figura 25 F).

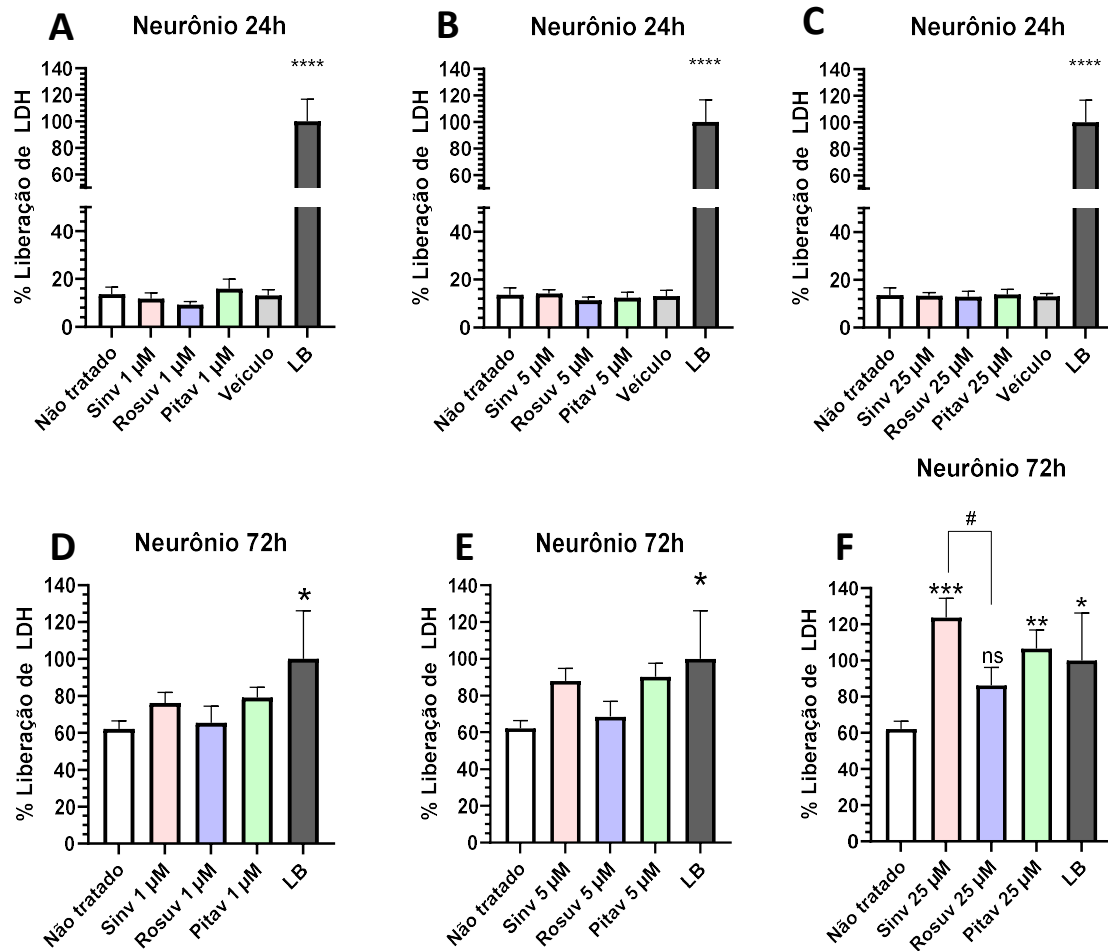


Figura 25. Liberação de Lactato desidrogenase (LDH) de neurônios tratados com estatinas. Células SH-SY5Y foram diferenciadas em neurônios maduros e em seguida foram estimuladas com diferentes estatinas durante 24 horas (A- C) ou 72 horas (D- F). Dados mostram média $\pm$ desvio padrão de 3 poços. Veículo = DMSO 0,125%, 0,025% ou 0,005%. Como teste de hipótese, foi utilizada a ANOVA welch, com pós-teste Dunnett T3, para os dados de 24h, e a ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey, para os dados de 72h. Para significância estatística foram considerados valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparado com o não tratado ou $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####) entre os grupos indicados.

5.7. O ZIKV induz a produção de metabólitos da via do mevalonato em micróglias humanas.

Sabe-se que as arboviroses tendem a regular positivamente a produção de lipídios, em especial o colesterol, o que favorece diversas etapas do ciclo viral. Esse fato é observado no contexto da infecção com o ZIKV, mas pouco foi investigado se esse aumento também ocorre em modelos clinicamente relevantes, como modelos neurais. Além do aumento de colesterol, as análises metabólicas realizadas durante a infecção por ZIKV não exploraram de forma abrangente a via do mevalonato, incluindo seus intermediários isoprenoides. Portanto, seria interessante caracterizar alterações nessa via durante o curso da infecção neural, buscando elucidar modulações importantes na infecção, o que pode identificar possíveis alvos para intervenções. Para esse fim, realizamos uma análise metabolômica após 48 horas de infecção com o ZIKV em células C20, utilizando a técnica de GC-MS.

Através de uma redução de dimensionalidade, a partir da análise de projeções ortogonais para análise discriminante de estruturas latentes (OPLS-DA), foi possível observar uma diferença entre os perfis metabólitos globais dos grupos não infectado e ZIKV (Figura 26 A). Não somente é interessante identificar diferenças globais em perfis metabólicos, mas é fundamental identificar quais vias e metabólitos medeiam essa distinção. Dada a modulação no metabolismo de colesterol induzida por flavivírus, foi verificado se metabólitos da via do mevalonato poderiam estar alterados. Observou-se que não apenas o farnesil e o isopentenil pirofosfato, mas também o colesterol, estavam aumentados na infecção com o ZIKV (Figura 26 B-D). Isso indica o papel diferencial da via do mevalonato, com o aumento do colesterol e dos isoprenoides, durante a infecção microglial com o ZIKV.

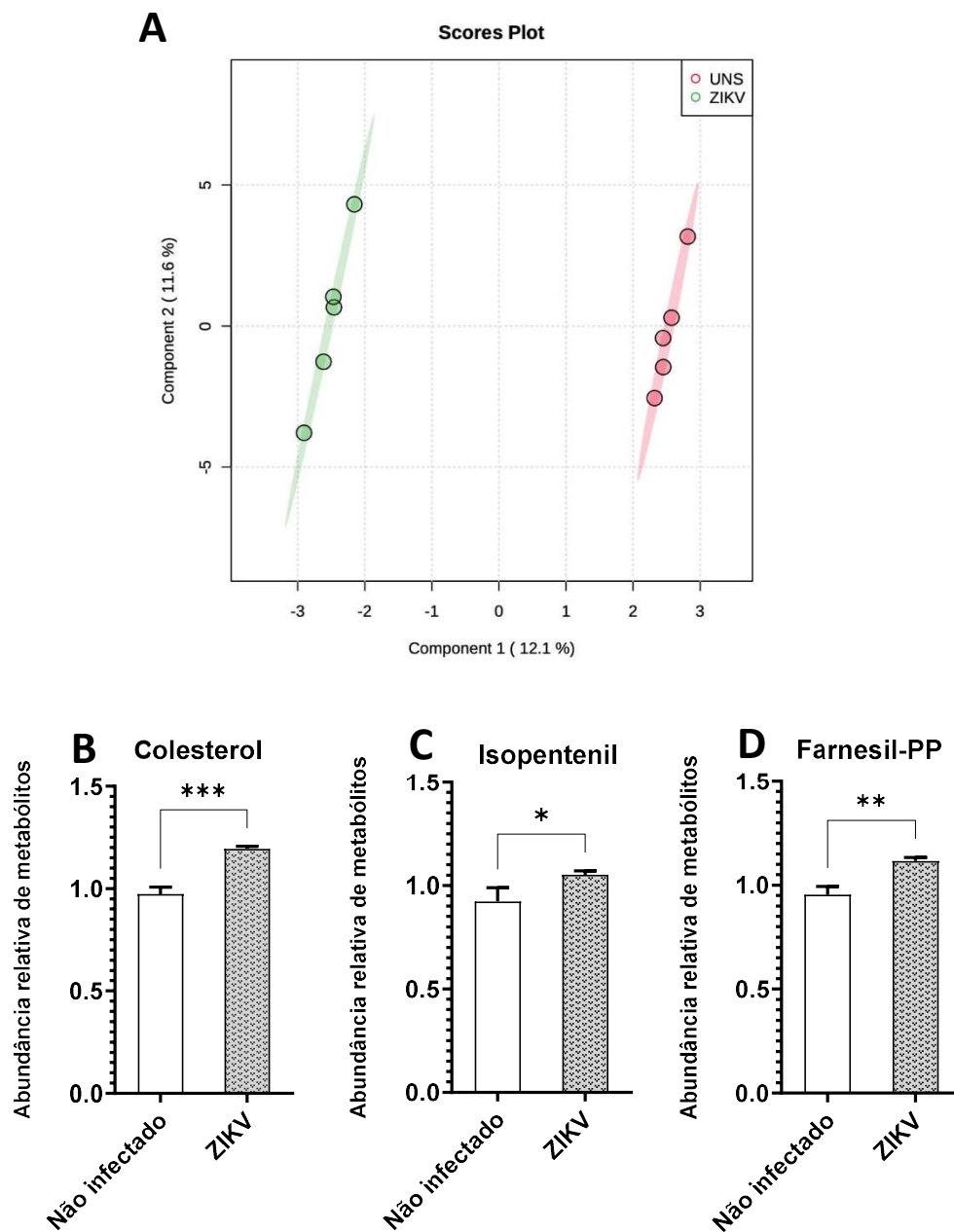


Figura 26. Perfil metabólico de células microgliciais infectadas com ZIKV. Células C20 foram infectadas (ou não) com ZIKV MOI 10. Após 48h de estímulo e infecção, foram submetidas à GC-MS, com posterior análise pela plataforma MetaboAnalyst, pela qual foi plotado o score OPLS-DA (A). Foram analisadas as abundâncias de colesterol (B), Isopentenil-PP (C) e Farnesil-PP (D). Para o cálculo de abundância relativa, foi utilizado o ribitol como padrão. Dados mostram média e desvio padrão. A diferença entre médias foi verificada via teste T. Para significância estatística foram considerados valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparados com o não infectado (UNS).

5.8. A rosuvastatina inibe a redução de viabilidade causada pelo ZIKV no tempo de 48 horas em micróglia humanas.

Dado o aumento da via do mevalonato durante a infecção, os passos seguintes tiveram como objetivo avaliar o impacto da redução dessa via, por meio de estatinas, durante a infecção. Células C20 foram tratadas com dois inibidores da HMGCR, rosuvastatina ou sinvastatina, na concentração de 1 μ M. O tratamento foi realizado por 1 hora antes da infecção e mantido durante todo o tempo de infecção com o ZIKV (MOI 1).

A infecção microglial com o ZIKV durante 48 horas levou a uma redução da viabilidade (Figura 27 A e 27 B). A presença da sinvastatina leva à redução da viabilidade mitocondrial e, durante a infecção microglial, agrava a redução de viabilidade gerada pelo vírus (Figura 27 A). A rosuvastatina 1 μ M, por outro lado, não apenas não reduziu a viabilidade em comparação ao não infectado, mas quando administrada concomitantemente ao ZIKV, preveniu a redução de viabilidade causada pelo vírus (Figura 27 B).

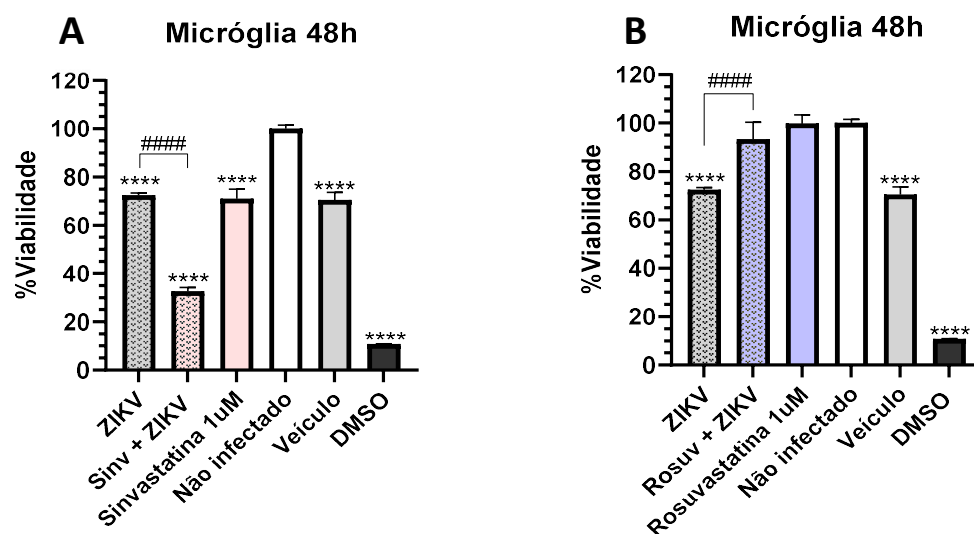


Figura 27. Efeito das estatinas na viabilidade mitocondrial de micróglia infectadas pelo ZIKV. Células C20 foram tratadas durante 1 hora com sinvastatina (A) ou rosuvastatina (B) antes da infecção e mantidas durante todo o período desta, que durou 48 horas. Veículo = DMSO 0,125%. DMSO = dimetilsulfóxido 50%. Gráficos mostram a média e o desvio padrão de 5 poços por condição. A diferença entre médias foi verificada via ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. Para significância estatística foram considerados valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparados com o não infectado ou $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####) entre os grupos indicados.

5.9. A rosuvastatina tem efeito antioxidante contra a ação do vírus Zika (ZIKV) em micróglia humana após 96 horas.

Observado o impedimento da redução da viabilidade decorrente do tratamento com rosuvastatina na infecção com o ZIKV, o foco seguinte foi caracterizar quais potenciais mecanismos mediarão este efeito atenuante. Sabidamente, a produção de ROS se correlaciona com vias de resposta a estressores. Naturalmente, em inúmeros processos patológicos, incluindo infecções virais, há a presença do estresse oxidativo. Especificamente no caso da infecção com o ZIKV é conhecida a indução da produção de espécies reativas (BRAZ-DE-MELO et al., 2019). Além disso, a micróglia pode ativamente produzir ROS através da ação da enzima NADPH oxidase (NOX) em respostas inflamatórias, incluindo o combate a patógenos (HASLUND-VINDING et al., 2016). A partir disso, foi medida a geração de ROS em células microgлияis infectadas com o ZIKV, tratadas ou não com sinvastatina e rosuvastatina.

Foi medida a geração de ROS após 72h de infecção (Figura 28 A). Não foi observada modulação significativa, tanto das estatinas, quanto do vírus ZIKV, em relação ao não infectado.

A partir disso, um tempo mais tardio foi averiguado. Após 96 horas de infecção, o ZIKV levou a um aumento significativo de ROS em comparação ao não infectado (Figura 28 B). As estatinas não aumentaram a geração de ROS isoladamente. Adicionalmente na presença do ZIKV, a rosuvastatina, e não a sinvastatina, levou a uma redução da geração de ROS em relação ao infectado, o que indica um papel antioxidante no contexto viral.

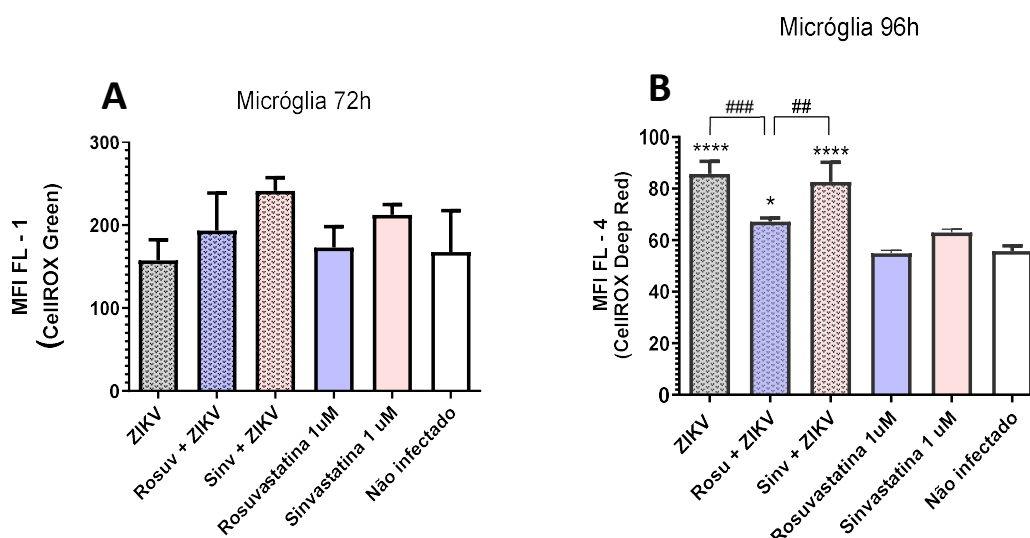


Figura 28. Produção de ROS em micróglia infectadas com ZIKV e tratadas com estatinas. Células C20 foram tratadas com sinvastatina ou rosuvastatina durante 1 hora antes da infecção e por 72 horas (A) ou 96 horas (B) durante a infecção com ZIKV MOI 1. Em seguida, a marcação de ROS, por meio das sondas CellROX Green ou Deep Red, foi medida. Gráficos mostram média e desvio padrão de 3 poços por condição. MFI = Mean Fluorescence Intensity. Diferença entre as médias foi testada com o teste de hipótese ONE WAY ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. Para significância estatística foram considerados valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****) comparado com o não infectado ou $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####) entre os grupos indicados.

5.10. A rosuvastatina não reduz a carga viral de micróglia infectadas com o ZIKV no tempo de 48 horas.

Dada a indução do colesterol durante a infecção microglial com o ZIKV e a melhora de parâmetros de viabilidade e estresse oxidativo na presença de rosuvastatina durante a infecção, seria interessante investigar se a rosuvastatina também reduz um parâmetro de replicação viral. Para isso foi medida, via RT-qPCR, a carga viral de células C20 tratadas com rosuvastatina e infectadas com o ZIKV durante 48h. Não foi observada modulação significativa quanto à produção de RNA viral durante o tratamento com 1 μ M de rosuvastatina (Figura 29).

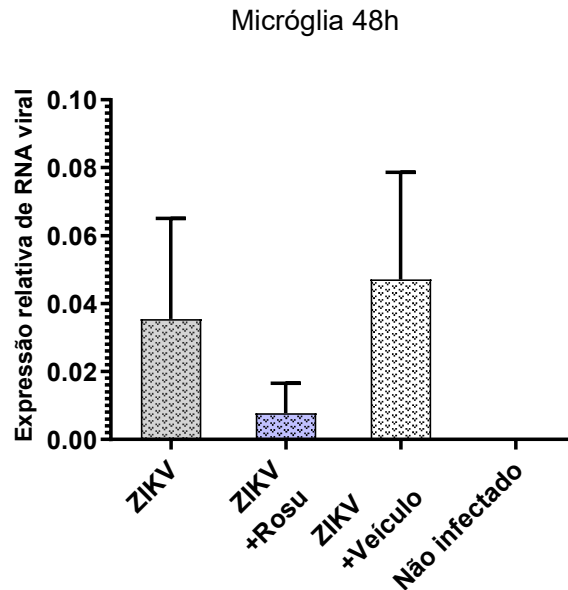


Figura 29. Carga viral de micróglias tratadas ou não com rosuvastatina e infectadas com o ZIKV. Células C20 tratadas com rosuvastatina durante 1 hora e durante as 48 horas de infecção com o ZIKV MOI 1. Posteriormente, a carga viral foi mensurada mediante a técnica de RT-qPCR. Veículo = DMSO 0,005%. Dados apresentam média e desvio padrão. Teste de hipótese realizado foi a ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey.

6. Discussão

6.1. Busca de possíveis mecanismos para efeitos citotóxicos neurológicos de estatinas.

Estatinas são os fármacos mais utilizados na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, e, a partir disso, se destacam como os fármacos mais utilizados do mundo. Apesar disso, uma alta proporção dos usuários abandona o tratamento devido à presença de efeitos colaterais. O abandono do tratamento é extremamente preocupante levando em consideração que doenças cardiovasculares são a maior causa de morte mundialmente. Os efeitos adversos são variados, englobando principalmente efeitos musculares e, também, efeitos relacionados ao sistema nervoso central. É crescente o número de artigos relacionado modulações microgliais a alterações/disfunções cognitivas ou comportamentais, o que levanta a questão de se esses efeitos adversos neurológicos são mediados por alterações microgliais.

Grande parte da literatura sobre o efeito de estatinas em células microgliais está focada em investigar os efeitos daquelas em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla. Entretanto, já foram relatados alguns efeitos deletérios de estatinas em células microgliais. Lindberg et al. (2005) demonstraram que tanto a sinvastatina quanto a atorvastatina levaram a uma redução de viabilidade microglial, bem como uma redução de IL-6. Observou-se que a rosuvastatina foi capaz de reduzir a proliferação e adesão celular microglial (KATA et al., 2016). Além disso, sinvastatina, lovastatina e atorvastatina induziram uma resposta inflamatória em células microgliais isoladas de primatas-não humanos, e esse efeito foi atribuído à inibição da síntese de colesterol, e não relacionado a síntese de isoprenoides. Curiosamente, células microgliais se mostraram mais sensíveis que macrófagos derivados da medula óssea dos mesmos doadores (VAN DER PUTTEN et al., 2012). Isso pode apontar uma maior sensibilidade microglial, entre as células imunológicas, em relação às estatinas. Embora em outros modelos celulares já tenha sido indicado que estatinas lipofílicas estão associadas a maiores efeitos citotóxicos, esse fenômeno não tinha sido demonstrado em células microgliais (WEI, G. et al., 2021). Além dos danos microgliais, a redução de viabilidade em células neuronais tratadas com estatinas lipofílicas também é coerente com dados anteriores da literatura (VURAL; TUĞLU, 2011; WANG, H. et al., 2022). Esses achados vão ao encontro de nossos dados, nos quais uma redução da viabilidade mitocondrial foi encontrada, acompanhada de um maior dano associado às estatinas lipofílicas e uma maior sensibilidade microglial.

É fundamental a identificação da resposta microglial não somente em termos de citotoxicidade, mas também em relação a parâmetros que possam indicar estresse ou inflamação. A partir disso, investigamos a biogênese de corpúsculo lipídico, geração de espécies reativas de oxigênio bem como a secreção de citocinas.

Corpúsculos lipídicos são organelas chave dentro do metabolismo lipídico. Além disso, podem levar não somente à disponibilização de lipídios para as mais diversas funções celulares, como também estar ligados à produção de eicosanoides, mediando respostas inflamatórias através de moléculas lipídicas (JARC, Eva; PETAN, 2020). A partir disso a variação no número de corpúsculos lipídicos é correlacionada com processos patológicos, podendo ser um indicador de estresse e ativação celular (D'AVILA; MAYA-MONTEIRO; BOZZA, 2008; JARC, E.; PETAN, 2019; LI, Y. et al., 2024). No presente estudo, foi identificado que estatinas levam à redução da biogênese

de corpúsculo lipídicos em 24 horas, especialmente na concentração de 5 μ M. A pitvastatina foi capaz de levar a uma redução desse parâmetro mesmo em 1 μ M, o que pode ser atribuído à potência de inibição da HMGCR juntamente com a capacidade de atravessar membranas, o que geraria uma maior biodisponibilidade. A ausência de redução em 1 μ M nas outras estatinas pode estar relacionada com a ausência da combinação desses dois fatores. Essa diminuição da biogênese de corpúsculo lipídicos pelas estatinas é esperada, na medida que ésteres de colesterol compõem o conteúdo dos corpúsculos lipídicos (LAYERENZA et al., 2013). Essa redução ocorre em paralelo com a morte celular, necessitando de maiores experimentos para indicar se a redução é absolutamente devida aos corpúsculos ou à morte celular.

Espécies reativas de oxigênio são produzidas tanto em processos essenciais ao funcionamento celular normal, quanto em processos ou condições patológicas. Entretanto, é interessante investigar se os danos citotóxicos das estatinas envolvem estresse oxidativo. O uso clínico de estatinas está associado a um efeito antioxidante sistêmico (MOON et al., 2014; ZINELLU; MANGONI, 2021). Estes efeitos envolvem uma redução da geração de ROS via NADPH oxidase (NOX), além de um aumento da expressão de catalase (WASSMANN et al., 2002). Apesar disso, há artigos mostrando uma geração de espécies reativas em células musculares, que é o tecido com maiores relatos de efeitos adversos associados às estatinas (BOUITBIR et al., 2012; ZHANG, Q. et al., 2022). Portanto, seria interessante saber se o estresse oxidativo poderia ocorrer também no sistema nervoso central. Nossos achados da geração de espécies reativas em 6 horas não nos permitem afirmar que essa toxicidade microglial é mediada pela geração de ROS.

Um processo inflamatório é essencial para a manutenção e integridade sistêmica, mas pode estar relacionado a um processo danoso, envolvendo danos teciduais através de uma resposta inflamatória desenfreada (WEI, Y. et al., 2022). Além disso, no contexto do SNC, a inflamação está correlacionada com alterações cognitivas ou comportamentais (CUNNINGHAM et al., 2009; MEKHORA; LAMPORT; SPENCER, 2024). Portanto, a investigação do perfil inflamatório microglial é fundamental no contexto do presente trabalho. Estatinas associam-se a efeitos anti-inflamatórios sistêmicos clinicamente, entretanto, tecidos relacionados a efeitos adversos, como os músculos, podem apresentar uma modulação para um perfil pró-inflamatório (HE et al., 2023; PADALA; THOMPSON, 2012). Além disso, em células imunológicas, e em concentrações

suprafisiológicas, estatinas induziram a um perfil inflamatório. Estatinas lipofílicas levaram a um aumento de células T secretoras IFN- γ , e um aumento de IL-18 e IL-1 β em monócitos, em um modelo de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ativadas (COWARD et al., 2006). Especificamente em relação à micróglia, VAN DER PUTTEN et al. (2012) demonstraram que estatinas lipofílicas estão relacionadas a uma resposta pró-inflamatória, com um aumento de TNF- α e IL-1 β em micróglias primárias de primatas não humanos, e que essa resposta é dependente da síntese de colesterol. Em contraste, a rosuvastatina foi associada a uma menor redução de IL-6 em células microgliais (FAMER; WAHLUND; CRISBY, 2010). Portanto, há evidências de um processo inflamatório de células imunológicas, incluindo micróglias, em resposta a estatinas lipofílicas, e uma redução de citocinas inflamatórias no tratamento com estatinas hidrofílicas. Em nossos resultados, identificamos que a rosuvastatina foi capaz de reduzir a secreção de IL-6, e que a pitavastatina induz um aumento de TNF- α , significativo tanto em comparação ao não tratado, quanto em comparação à rosuvastatina. Essa modulação indica um perfil mais pró-inflamatório da pitavastatina em relação à rosuvastatina. Apesar de estudos já terem explorado individualmente o papel das estatinas em células microgliais, não há registros de um estudo que compare, em um mesmo modelo, os efeitos diferenciais de estatinas lipofílicas e hidrofílicas no contexto inflamatório microglial. A neuroinflamação pode gerar uma hipersensibilidade neuronal, ativação microglial e ativação de receptores gabaérgicos, gerando manifestações clínicas deletérias, como dores, déficits cognitivos e de memória, respectivamente, que possuem um paralelo com alguns dos efeitos adversos neurológicos relatados por usuários de estatinas (VERGNE-SALLE; BERTIN, 2021; WANG, D.-S. et al., 2012; ZHAO et al., 2019).

Morte celular regulada é um conceito que engloba um tipo de morte caracterizado por vias, maquinarias moleculares e efetores especificamente orquestrados. Esse processo está associado não somente a processos patológicos, mas também ao desenvolvimento e à homeostase (TANG, D. et al., 2019). A identificação do tipo de morte celular permite compreender não apenas seu impacto em nível celular, mas também suas consequências em nível tecidual ou sistêmico. No presente trabalho, tanto em tempos iniciais quanto em tempos tardios, observamos um aumento de morte, especialmente em estatinas lipofílicas, e que essa morte é majoritariamente apoptótica. É relatada a capacidade de estatinas induzirem apoptose em células tumorais *in vitro*. Estudos no campo cardiovascular também demonstraram que especialmente estatinas lipofílicas estão ligadas a uma morte

apoptótica em células musculares lisas, e esses efeitos estão relacionados à síntese de isoprenoides (GUIJARRO et al., 1998; KATSIKI et al., 2010; NEWTON et al., 2003). Não há dados na literatura que indiquem qual tipo de morte as estatinas podem induzir em células microgliais, entretanto, há estudos em outras células imunológicas, como os monócitos e os macrófagos. Em monócitos, concentrações a partir de 1 μ M de mevastatina levam à apoptose em 24h (VAMVAKOPOULOS; GREEN, 2003). Em macrófagos, somente estatinas lipofílicas levaram a uma morte, esta que foi caracterizada como apoptótica (CROONS et al., 2010). Portanto, embora a morte microglial em resposta a estatinas não tenha sido relatada na literatura, há precedentes de indução de uma morte apoptótica em outros modelos de células imunes. Adicionalmente, demonstramos a presença de uma morte lítica minoritária nessas células microgliais, o que pode contribuir para um perfil pró-inflamatório, levando a efeitos deletérios no SNC.

De forma geral, observamos uma redução de viabilidade, um aumento de parâmetros inflamatórios e a indução de morte apoptótica em células microgliais, juntamente com uma citotoxicidade mais tardia de neurônios. Importante notar que a lipofilicidade mais do que a capacidade de reduzir a HMGCR foi o principal fator responsável por explicar a distinção nos efeitos entre as estatinas. Os efeitos colaterais musculares de estatinas envolvem também danos mitocondriais e, em micróglia, observamos uma redução da viabilidade mitocondrial, assim como a indução de morte apoptótica, que intrinsicamente envolve um dano mitocondrial. É evidente que são necessários maiores experimentos para comprovar a necessidade e suficiência mitocondrial na explicação de efeitos adversos relacionados ao SNC, contudo essa direção de investigação se mostra como promissora. Vale destacar que isoprenoides levam à produção de Coenzima Q e que a sua suplementação com esta mostrou resultados positivos na mitigação dos efeitos adversos das estatinas (QU et al., 2018). Juntamente com isso, doenças mitocondriais afetam principalmente músculos e o cérebro (HAAS; ZOLKIPLI, 2014).

Um ambiente citotóxico e pró-inflamatório, exacerbado ainda pela presença de uma potencial morte lítica, pode estar na base de possíveis explicações relativas às alterações cognitivas ou comportamentais. Estatinas lipofílicas apresentam uma maior capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica, o que pode ligá-las aos maiores relatos de efeitos adversos neurológicos (BOTTI et al., 1991). Os neurônios se mostraram mais resistentes aos danos causados por estatinas do que as células microgliais. Esse fenômeno

pode decorrer da menor produção de colesterol em neurônios, levando a uma menor sensibilidade neuronal à redução da via do mevalonato (MOUTINHO; NUNES; RODRIGUES, 2017). Conjuntamente, nossos dados fornecem insights sobre os efeitos de estatinas no sistema nervoso central, apontando para direções de possíveis mecanismos. Esse conhecimento é de ampla relevância para a compreensão de mecanismos moleculares de efeitos adversos, possibilitando manejo clínico desses efeitos para uns dos fármacos mais utilizados no mundo, além de poder contribuir para o desenvolvimento de fármacos mais específicos e menos associados a efeitos deletérios.

6.2. Impacto de estatinas na infecção microglial com o ZIKV.

Vírus do gênero *Orthoflavivirus* manipulam o metabolismo lipídico de forma a propiciar a infecção viral. É abundantemente relatada a capacidade desse gênero em induzir alterações em diferentes classes de lipídios durante a infecção. Propõe-se que esse aumento que esse aumento não apenas forneça lipídios como função energética, mas que lipídios, como o colesterol, desempenhem funções diretas em processos do ciclo viral. O aumento da síntese e captação de colesterol durante a infecção, junto com o efeito antiviral da redução de colesterol, apontam para uma importância, em especial, deste em infecções flavivirais (ESPAÑO et al., 2019; LIEFHEBBER et al., 2014; SOTO-ACOSTA et al., 2013; STOYANOVA et al., 2022).

Análises metabólicas prévias demonstraram a capacidade da infecção com o ZIKV em modular lipídeos, incluindo o colesterol. A infecção de placentas humanas com o ZIKV leva a um aumento de fosfolipídios e diacilglicerol (CHEN et al., 2020). Hehner et al. (2024) realizaram uma lipidômica de diferentes Orthoflavivírus, incluindo o ZIKV, em diferentes tempos de infecção em células epiteliais hepáticas Huh7. Neste estudo, foi verificada a capacidade do ZIKV de induzir aumento de certos ésteres de colesterol, triglicerídeos, bem como lisofosfolipídios após 12 horas de infecção. Singh et al. (2024) mostraram um aumento de colesterol, bem como de HMGCR, HMGCS, FASN durante a infecção com o ZIKV em células epiteliais retiniais de pigmento. Diop et al., (2018) demonstraram a capacidade da infecção com o ZIKV em elevar os níveis de lisofosfolipídios e fosfolipídios em células microgliais, entretanto nada foi mencionado sobre os níveis de colesterol ou a via do mevalonato.

No presente trabalho demonstramos que a infecção com o ZIKV leva a um aumento de colesterol, isopentenil pirofosfato e farnesil pirofosfato, portanto, foi observado um aumento de metabólitos da via do mevalonato. O ineditismo desse achado se concentra, primeiro, no fato de ter sido feito em células microgliais humanas, ou seja, em um modelo neurológico de relevância no contexto da infecção com o ZIKV, e é fundamental identificar como os protagonistas imunológicos do sistema nervoso central são modulados durante esse tipo de infecção. Segundo, apesar do aumento da síntese de colesterol ter sido relatado em outros contextos, a via do mevalonato em si, com seus outros produtos e intermediários, não tinha sido explorada no contexto da infecção com o ZIKV, até onde foi possível averiguar.

Enquanto é amplamente descrito que a interação entre macrófagos e um ambiente rico em colesterol leva à formação de células espumosas, correlacionadas com uma resposta pró-inflamatória, pouco é conhecido sobre como a micróglia responde a ambientes ricos em colesterol. O acúmulo de corpúsculos lipídicos em micróglia está correlacionado com um fenótipo disfuncional e pró-inflamatório (MARSCHALLINGER et al., 2020). O Alzheimer é uma doença neurodegenerativa associada a um processo inflamatório microglial crônico, na qual o maior fator de risco genético individual é um alelo do gene que codifica a lipoproteína APOE (HANSEN; HANSON; SHENG, 2018; XIE; VAN HOECKE; VANDENBROUCKE, 2022). Análises *post-mortem* de cérebros de indivíduos com Alzheimer apontam para um enriquecimento de colesterol (CHAN et al., 2012). A doença de Niemann-Pick tipo C (NPC) é causada por uma mutação nos genes NPC1 ou NPC2, que codificam transportadores de colesterol, o que leva a um aumento de colesterol intracelular não esterificado e, em consequência, um processo inflamatório e inúmeras implicações relacionadas ao SNC. Em modelos de estudos de NPC *in vitro* e *in vivo*, pesquisadores identificaram uma ativação e um processo inflamatório microglial (QIAO et al., 2024). Portanto, apesar de pouco ser conhecido sobre o impacto do aumento do colesterol microglial, é possível que esse fenótipo leve a uma ativação microglial e, consequentemente a um processo inflamatório, o que poderia agravar uma patogênese viral. Entretanto não é possível saber se esse aumento durante a infecção com o ZIKV seria suficiente para um desencadeamento desse estado.

Outra faceta do aumento do colesterol microglial é um possível aumento de colesterol no sistema nervoso central. Apesar da infecção com o ZIKV estar correlacionada com vias que levam a um aumento de colesterol, o transportador ABCG1

que realiza o efluxo de colesterol, é aumentado durante a infecção de células RPE (SINGH, P. K. et al., 2018). Seria plausível que, caso um aumento de colesterol favoreça a infecção, os vírus poderiam desenvolver formas de aumentar o colesterol paracrinamente, de forma a criar um ambiente mais favorável à infecção. Nesse sentido, astrócitos e micróglia podem atuar como fornecedores de colesterol no sistema nervoso central (FÜNFSCILLING et al., 2012). Curiosamente, um acúmulo de colesterol pode estar relacionado a um prejuízo da fagocitose no sistema nervoso central (CANTUTI-CASTELVETRI et al., 2018).

Fármacos hipolipemiantes, como estatinas, foram usados na redução da síntese de colesterol e demonstraram efeitos positivos em diferentes modelos de infecções virais. Estatinas apresentaram efeitos positivos contra os vírus da parainfluenza do tipo 1, SARS-CoV-2, DENV e ZIKV diminuindo parâmetros como entrada viral, replicação, montagem e mortalidade (BAJIMAYA et al., 2017; ESPAÑO et al., 2019; NIRANJAN et al., 2022; STOYANOVA et al., 2022; TEIXEIRA et al., 2022). No nosso trabalho, foi verificado que a rosuvastatina, e não a sinvastatina, demonstra efeito protetor no contexto da infecção microglial com o ZIKV, impedindo a redução de viabilidade ocasionada pela infecção viral. Esse resultado é inédito na literatura, pois estudos anteriores envolvendo ZIKV e estatinas identificaram, primeiro, um efeito positivo associado às estatinas lipofílicas, e não hidrofílicas, e, segundo, utilizaram modelos não representativos do ambiente nervoso.

ROS é um termo que abrange uma gama de moléculas que possuem oxigênio originadas por reações redox ou excitação eletrônica. ROS regulam funções homeostáticas em níveis abaixo de 100 nM, desempenhando papéis em sinalizações relacionadas à proliferação, diferenciação e migração. Entretanto, sua abundância tem implicações prejudiciais, levando à oxidação inespecífica de moléculas, causando danos, parada do ciclo celular e morte celular, por meio de um processo conhecido como estresse oxidativo (HEINKE, 2022; OKA et al., 2022; SIES; JONES, 2020). Assim, o estresse oxidativo está envolvido em processos patológicos, incluindo doenças neurodegenerativas, problemas cardiovasculares, câncer e infecções virais.

O papel de ROS durante infecções pode ser dual. Por um lado, a produção de ROS pode ser utilizada diretamente como forma de inativação do patógeno e como um segundo mensageiro levando a respostas imunológicas que visam a eliminação do patógeno (SPOONER; YILMAZ, 2011). Por outro lado, certos vírus evoluíram de modo a cooptar

esse estresse oxidativo para benefício próprio. Por exemplo, a proteína NS5 de flavivírus desempenha melhor sua função de *capping* na presença de ROS (GULLBERG et al., 2015). O *status* redox é preditivo da capacidade da proteína Spike de SARS-CoV-2 de se ligar ao receptor ACE2 (HATI; BHATTACHARYYA, 2020). ROS aumentam a produção viral de EV-A71, o que estava associado com a redução do fator de transcrição NRF2. Portanto, tanto diretamente, quanto indiretamente, vírus podem se beneficiar da produção de espécies reativas de oxigênio. Desse modo, é abundantemente descrito na literatura o aumento de ROS durante infecções virais (FOO et al., 2022). Além disso, o uso de antioxidantes pode levar a uma redução tanto da carga viral *in vitro* quanto uma melhora da infecção *in vivo* (SANDER et al., 2022). Especificamente quanto ao ZIKV, sua infecção demonstra capacidade de induzir o estresse oxidativo, tanto em modelos gliais, neuronais, quanto em modelos *in vivo* (ALMEIDA et al., 2020; BRAZ-DE-MELO et al., 2019; LEDUR et al., 2020). Entretanto, o papel de espécies reativas na infecção com o ZIKV parece complexo. Por um lado, há estudos com antioxidantes levando a uma redução da replicação e produção viral, ou que o ZIKV necessita de peroxidação lipídica para estabilização da replicação viral, indicando um favorecimento viral na presença de ROS (DENOLLY et al., 2023; LIM et al., 2024; PEREIRA et al., 2021). Por outro lado, outros estudos apontam que uma redução de ROS poderia beneficiar a infecção do ZIKV (LU et al., 2021; SHUKLA; RASTOGI; SINGH, 2021).

No presente trabalho, demonstramos que a rosuvastatina apresentou efeito antioxidante para micróglias infectadas com o ZIKV. É conhecido o efeito antioxidante de estatinas, podendo levar a uma redução da expressão de NADPH oxidase (NOX) e um aumento de enzimas antioxidantes (DUARTE et al., 2016). Essa redução da geração de espécies reativas no contexto antiviral poderia não somente atenuar danos oriundos de um fenômeno de estresse oxidativo acoplado a um processo inflamatório exacerbado, como também potencialmente prejudicar um favorecimento viral fruto de uma cooptação do estresse oxidativo. Não é possível afirmar se essa redução de ROS poderia favorecer uma evasão imunológica, sendo necessárias maiores investigações nesse sentido.

Não foi observada redução da carga viral em decorrência do tratamento com rosuvastatina. Isso sugere que, embora os efeitos deletérios de um processo infeccioso possam ser atenuados, a replicação viral em si pode não ser afetada. No entanto, estudos anteriores demonstraram a capacidade de estatinas lipofílicas levarem à redução da carga viral *in vitro* e *in vivo* em outros modelos virais, incluindo Orthoflavivírus

(MACKENZIE; KHROMYKH; PARTON, 2007; TEIXEIRA et al., 2022). A presença de um alto desvio no experimento de carga viral pode ter implicado em perda de poder estatístico, e, portanto, são necessárias maiores investigações nessa direção.

Estatinas não somente levam a uma redução da síntese de colesterol, mas também reduzem a síntese de isoprenoides, como o farnesil e geranil pirofosfato. Há uma alta presença de artigos investigando o metabolismo de colesterol em infecções, usando para isso diferentes modelos de redução da síntese de colesterol e comprovando a importância deste durante infecções com flavivírus. Entretanto, um número limitado de artigos investiga como isoprenoides impactam infecções virais. Nesses há evidências de que a redução da isoprenoides também possa gerar um efeito antiviral, e, portanto, seria interessante diferenciar quais efeitos são mediados pelo colesterol e quais podem ser atribuídos aos isoprenoides (MARAKASOVA et al., 2017; WANG, C. et al., 2005; YE et al., 2003).

Embora o presente trabalho tenha focado em investigando o impacto da redução do colesterol, mediante o uso de estatinas, durante a infecção com o ZIKV em micróglias, o real impacto do colesterol provavelmente é mais complexo do que uma visão dicotômica reducionista de simplesmente favorecer ou não a infecção. A partir da literatura aqui trazida, é evidente que a redução do colesterol durante a infecção parece uma direção promissora, no entanto, é fundamental investigar outros métodos além da inibição da síntese de colesterol. Seria interessante abordagens como: inibir enzimas que somente afetam a síntese de colesterol e não de isoprenoides, como a esqualeno sintase; reduzir o conteúdo de colesterol na membrana, com M β CD; adicionar colesterol ou isoprenoides a fim de isolar seus efeitos. Entretanto, existem estudos na direção contrária, indicando que, em certos contextos, um excesso de colesterol livre pode ter ações antivirais (LEE et al., 2008; SCHÖBEL et al., 2024). É provável que não somente uma redução ou aumento geral de colesterol seja importante, mas que haja um balanço mais refinado de colesterol livre e esterificado considerando cada local de presença deste, como membrana celular, endossomas, membranas de organelas e etc. Além disso, o colesterol pode afetar indiretamente a infecção viral, por exemplo, ao modular a via do interferon. Apesar disso, nossos achados contribuem para uma elucidação do papel da via do mevalonato durante a infecção microglial com o ZIKV, indicando possíveis vias de intervenção para tratamentos.

7. Conclusões

A partir dos nossos achados, podemos concluir que, em micróglias, citotoxicidade e morte celular foram mais pronunciadas no tratamento com estatinas lipofílicas. Em micróglias, foi identificada morte lítica e, principalmente, apoptótica. Essa citotoxicidade ocorreu de forma independente da geração de ROS em tempos iniciais, mas foi acompanhada da redução da biogênese de corpúsculos lipídicos em ambos os tipos de estatinas. Ademais, um perfil pró-inflamatório foi mais associado à pitavastatina do que à rosuvastatina.

Em neurônios, somente estatinas lipofílicas induziram citotoxicidade e morte lítica. Portanto, nossos resultados indicam que as estatinas lipofílicas aumentam a citotoxicidade e a morte celular em comparação com a estatina hidrofílica, tanto em micróglias quanto em neurônios (Figura 29).

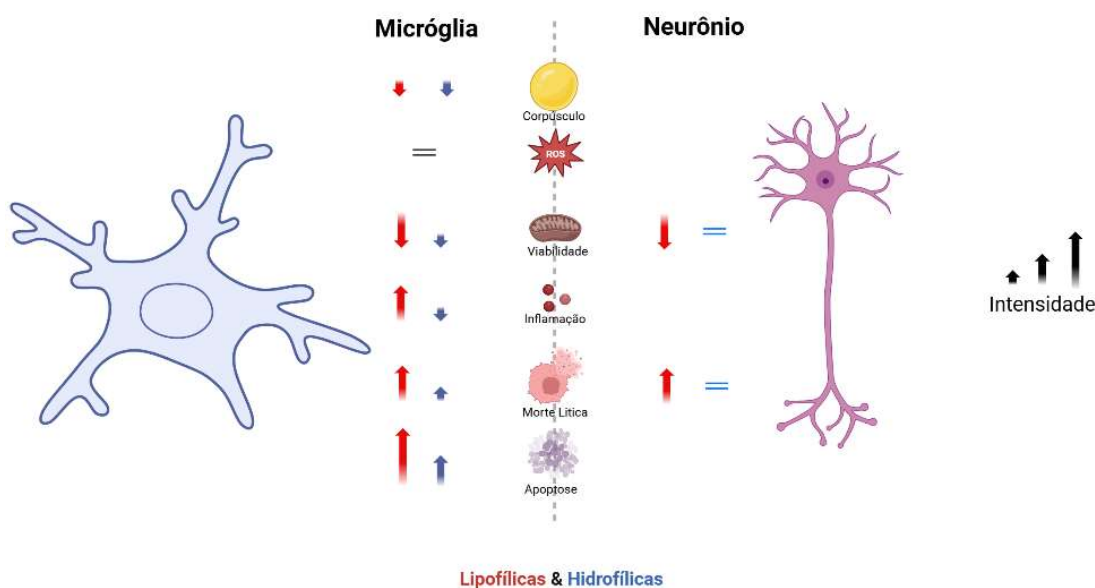


Figura 30. Conclusões acerca dos mecanismos citotóxicos de estatinas em células microgliais e neuronais. Setas vermelhas indicam modulações de estatinas lipofílicas. Seta azul indicam modulação da estatina hidrofílica. Aumento (↑). Redução (↓). Sem modulação (=). Criado via Biorender.

Por fim, foi demonstrado uma importância da via do mevalonato durante a infecção microglial, por meio da comprovação do seu aumento durante a infecção, bem como da constatação de que o impedimento dessa via atenua tanto a redução de viabilidade quanto o estresse oxidativo decorridos da infecção com o ZIKV, apesar de não modular a carga viral (Figura 30).

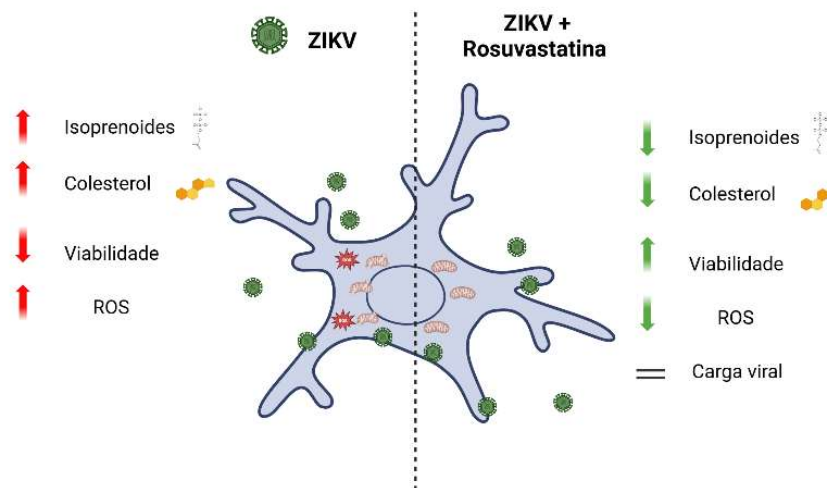


Figura 31. Conclusões acerca do impacto de estatinas na infecção microglial com ZIKV. Aumento (↑). Redução (↓). Sem modulação (=). Criado via Biorender.

8. Perspectivas e limitações

Para avançar na compreensão dos efeitos das estatinas na infecção pelo ZIKV, é fundamental distinguir os efeitos do colesterol e dos isoprenoides, tanto nos efeitos adversos quanto no contexto da infecção. Isso pode ser alcançado adicionando colesterol ou isoprenoides, ou inibindo seletivamente outras enzimas da via do mevalonato, reduzindo especificamente os níveis de colesterol ou isoprenoides.

Além disso, é importante avaliar se esses mecanismos tóxicos em micróglias ocorrem em concentrações próximas às fisiológicas. Outra linha promissora de investigação é a avaliação dos danos mitocondriais, pois a redução de isoprenoides pode reduzir os níveis de coenzima Q, e nossos achados apontam na direção de danos mitocondriais, manifestados pela perda de viabilidade mitocondrial e pela morte apoptótica. Nesse sentido, seria interessante investigar se a suplementação com coenzima Q pode reverter esses efeitos.

A avaliação da geração de partículas infectivas, por meio dos ensaios de PFU e TCID₅₀, pode ser esclarecedora para determinar se outras etapas do ciclo viral são afetadas. A quantificação da resposta de interferon em micróglias tratadas com estatinas

poderia, também, contribuir para investigar se esses fármacos exercem efeitos positivos na infecção pelo ZIKV.

Por fim, seria interessante investigar o papel de células astrocitárias nos dois cenários, considerando que os astrócitos são os principais responsáveis pela produção de colesterol no sistema nervoso central e que o ZIKV apresenta tropismo por esse tipo celular.

Esta abordagem integrada pode oferecer subsídios importantes para uma compreensão mais completa dos mecanismos subjacentes aos efeitos adversos das estatinas no SNC e do papel da via do mevalonato durante a infecção com o ZIKV.

9. Referências

Abdelbasset M, Saron WAA, Ma D, Rathore APS, Kozaki T, Zhong C, et al. Differential contributions of fetal mononuclear phagocytes to Zika virus neuroinvasion versus neuroprotection during congenital infection. *Cell* 2024;187:7511-7532.e20. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2024.10.028>.

Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Castillo-Medina LF, Rodríguez Y, Pacheco Y, Halstead S, et al. Autoimmune Neurological Conditions Associated With Zika Virus Infection. *Front Mol Neurosci* 2018;11:116. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2018.00116>.

Alberts AW. Lovastatin and simvastatin--inhibitors of HMG CoA reductase and cholesterol biosynthesis. *The Cardiology* 1990;77:14–21. <https://doi.org/10.1159/000174688>.

Almeida LT, Ferraz AC, da Silva Caetano CC, da Silva Menegatto MB, dos Santos Pereira Andrade AC, Lima RLS, et al. Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities in vitro and in vivo. *Virus Res* 2020;286:198084. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2020.198084>.

de Amorin Vilharba BL, Yamamura M, de Azevedo MV, Fernandes W de S, Santos-Pinto CDB, de Oliveira EF. Disease burden of congenital Zika virus syndrome in Brazil and its association with socioeconomic data. *Scientific Reports* 2023 13:1 2023;13:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38553-4>.

Averbukh LD, Turshudzhyan A, Wu DC, Wu GY. Statin-induced Liver Injury Patterns: A Clinical Review. *J Clin Transl Hepatol* 2022;10:543. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00271>.

Bajimaya S, Hayashi T, Frankl T, Bryk P, Ward B, Takimoto T. Cholesterol reducing agents inhibit assembly of type I parainfluenza viruses. *Virology* 2017;501:127–35. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.011>.

Beggs S, Trang T, Salter MW. P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nat Neurosci* 2012;15:1068–73. <https://doi.org/10.1038/NN.3155>.

Bhat EA, Ali T, Sajjad N, kumar R, Bron P. Insights into the structure, functional perspective, and pathogenesis of ZIKV: an updated review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2023;165:115175. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2023.115175>.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013 496:7446 2013;496:504–7. <https://doi.org/10.1038/nature12060>.

Bilbo SD, Block CL, Bolton JL, Hanamsagar R, Tran PK. Beyond infection - Maternal immune activation by environmental factors, microglial development, and relevance for autism spectrum disorders. *Exp Neurol* 2018;299:241–51. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2017.07.002>.

Björkhem I, Meaney S. Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:806–15. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b>.

Blais JE, Wei Y, Yap KK, Alwafi H, Ma TT, Brauer R, et al. Trends in lipid-modifying agent use in 83 countries. *Atherosclerosis* 2021a;328:44–51. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2021.05.016>.

Blais JE, Wei Y, Yap KK, Alwafi H, Ma TT, Brauer R, et al. Trends in lipid-modifying agent use in 83 countries. *Atherosclerosis* 2021b;328:44–51. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2021.05.016>.

Bobermin LD, Quincozes-Santos A, Santos CL, Varela APM, Teixeira TF, Wartchow KM, et al. Zika virus exposure affects neuron-glia communication in the hippocampal

slices of adult rats. *Scientific Reports* 2020 10:1 2020;10:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78735-y>.

Botti RE, Triscari J, Pan HY, Zayat J. Concentrations of pravastatin and lovastatin in cerebrospinal fluid in healthy subjects. *Clin Neuropharmacol* 1991a;14:256–61. <https://doi.org/10.1097/00002826-199106000-00010>.

Botti RE, Triscari J, Pan HY, Zayat J. Concentrations of pravastatin and lovastatin in cerebrospinal fluid in healthy subjects. *Clin Neuropharmacol* 1991b;14:256–61. <https://doi.org/10.1097/00002826-199106000-00010>.

Bottorff M, Hansten P. Long-term Safety of Hepatic Hydroxymethyl Glutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors: The Role of Metabolism—Monograph for Physicians. *Arch Intern Med* 2000;160:2273–80. <https://doi.org/10.1001/ARCHINTE.160.15.2273>.

Bouitbir J, Charles AL, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J, et al. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a “mitohormesis” mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J* 2012;33:1397–407. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHR224>.

Branche E, Wang YT, Viramontes KM, Valls Cuevas JM, Xie J, Ana-Sosa-Batiz F, et al. SREBP2-dependent lipid gene transcription enhances the infection of human dendritic cells by Zika virus. *Nature Communications* 2022 13:1 2022;13:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33041-1>.

Braz-De-Melo HA, Pasquarelli-do-Nascimento G, Corrêa R, das Neves Almeida R, de Oliveira Santos I, Prado PS, et al. Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. *Sci Rep* 2019a;9. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-56556-Y>.

Braz-De-Melo HA, Pasquarelli-do-Nascimento G, Corrêa R, das Neves Almeida R, de Oliveira Santos I, Prado PS, et al. Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against Zika virus infection in human SH-SY5Y cells. *Scientific Reports* 2019 9:1 2019b;9:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56556-y>.

Brés P. [Recent data from serological surveys on the prevalence of arbovirus infections in Africa, with special reference to yellow fever]. *Bull World Health Organ* 1970.

Bronger H, König J, Kopplow K, Steiner HH, Ahmadi R, Herold-Mende C, et al. ABCC Drug Efflux Pumps and Organic Anion Uptake Transporters in Human Gliomas and the Blood-Tumor Barrier. *Cancer Res* 2005;65:11419–28. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1271>.

Brown AJ, Galea AM. Cholesterol as an evolutionary response to living with oxygen. *Evolution (N Y)* 2010;64:2179–83. <https://doi.org/10.1111/J.1558-5646.2010.01011.X>.

Cantuti-Castelvetri L, Fitzner D, Bosch-Queralt M, Weil MT, Su M, Sen P, et al. Defective cholesterol clearance limits remyelination in the aged central nervous system. *Science* (1979) 2018;359:684–8. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN4183/SUPPL_FILE/AAN4183_CANTUTI-CATSTELVETRI_SM.PDF.

Cao P, Hanai J, Tanksale P, Imamura S, Sukhatme VP, Lecker SH. Statin-induced muscle damage and atrogen-1 induction is the result of a geranylgeranylation defect. *The FASEB Journal* 2009;23:2844–54. <https://doi.org/10.1096/FJ.08-128843>.

Di Cesare M, McGhie DV, Perel P, Mwangi J, Taylor S, Pervan B, et al. The Heart of the World. *Glob Heart* 2024;19:11. <https://doi.org/10.5334/GH.1288>.

Chan RB, Oliveira TG, Cortes EP, Honig LS, Duff KE, Small SA, et al. Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2012;287:2678–88. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.274142>.

Chen Q, Gouilly J, Ferrat YJ, Espino A, Glaziou Q, Cartron G, et al. Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta. *Nature Communications* 2020 11:1 2020;11:1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16754-z>.

Cohen JD, Brinton EA, Ito MK, Jacobson TA. Understanding Statin Use in America and Gaps in Patient Education (USAGE): An internet-based survey of 10,138 current and former statin users. *J Clin Lipidol* 2012;6:208–15. <https://doi.org/10.1016/J.JACL.2012.03.003>.

Colantonio LD, Rosenson RS, Deng L, Monda KL, Dai Y, Farkouh ME, et al. Adherence to statin therapy among US adults between 2007 and 2014. *J Am Heart Assoc* 2019;8. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010376/ASSET/9BDE2EC3-C311-490D-A582-0366CE120DF6/ASSETS/GRAPHIC/JAH33768-FIG-0007.PNG>.

Collins R, Reith C, Emberson J, Armitage J, Baigent C, Blackwell L, et al. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *The Lancet* 2016;388:2532–61. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31357-5/ASSET/FD28ADE9-5FEB-43ED-B461-0E7B122F5AD7/MAIN.ASSETS/GR1.JPG](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31357-5/ASSET/FD28ADE9-5FEB-43ED-B461-0E7B122F5AD7/MAIN.ASSETS/GR1.JPG).

Corrao G, Soranna D, Casula M, Merlino L, Porcellini MG, Catapano AL. High-potency statins increase the risk of acute kidney injury: evidence from a large population-based study. *Atherosclerosis* 2014;234:224–9. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2014.02.022>.

Cortes VA, Busso D, Maiz A, Arteaga A, Nervi F, Rigotti A. Physiological and pathological implications of cholesterol. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2014;19:416–28. <https://doi.org/10.2741/4216>.

Coward WR, Marei A, Yang A, Vasa-Nicotera MM, Chow SC. Statin-Induced Proinflammatory Response in Mitogen-Activated Peripheral Blood Mononuclear Cells through the Activation of Caspase-1 and IL-18 Secretion in Monocytes. *The Journal of Immunology* 2006;176:5284–92. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.176.9.5284>.

Croons V, De Meyer I, Houten SM, Martinet W, Bult H, Herman AG, et al. Effect of statins on the viability of macrophages and smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;55:269–75. <https://doi.org/10.1097/FJC.0B013E3181D0BEC3>.

Cunningham C, Campion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JFC, Deacon RMJ, et al. Systemic Inflammation Induces Acute Behavioral and Cognitive Changes and Accelerates Neurodegenerative Disease. *Biol Psychiatry* 2009;65:304. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2008.07.024>.

Darwish MA, Hoogstraal H, Roberts TJ, Ahmed IP, Omar F. A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983;77:442–5. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90106-2](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90106-2).

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V., Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005;8:752–8. <https://doi.org/10.1038/NN1472>.

D’Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol* 2008;8:1308–15. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2008.01.035>.

Deichstetter P. The Effect of Climate Change on Mosquito-Borne Diseases. *Am Biol Teach* 2017;79:169–73. <https://doi.org/10.1525/ABT.2017.79.3.169>.

Deng F, Tuomi SK, Neuvonen M, Hirvensälo P, Kulju S, Wenzel C, et al. Comparative Hepatic and Intestinal Efflux Transport of Statins. *Drug Metabolism and Disposition* 2021;49:750–9. https://doi.org/10.1124/DMD.121.000430/ATTACHMENT/54254C6C-E3CA-46A8-A526-D32880BED6ED/MMC1_SUPP_FILE.PDF.

Denolly S, Stukalov A, Barayeu U, Rosinski AN, Kritsiligkou P, Joecks S, et al. Zika virus remodelled ER membranes contain proviral factors involved in redox and methylation pathways. *Nature Communications* 2023 14:1 2023;14:1–20. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43665-6>.

Dias SSG, Cunha-Fernandes T, Souza-Moreira L, Soares VC, Lima GB, Azevedo-Quintanilha IG, et al. Metabolic reprogramming and lipid droplets are involved in Zika virus replication in neural cells. *J Neuroinflammation* 2023;20:1–15. <https://doi.org/10.1186/S12974-023-02736-7/FIGURES/7>.

Dick RA, Goh SL, Feigenson GW, Vogt VM. HIV-1 gag protein can sense the cholesterol and acyl chain environment in model membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:18761–6. https://doi.org/10.1073/PNAS.1209408109/SUPPL_FILE/PNAS.201209408SI.PDF.

Diop F, Vial T, Ferraris P, Wichit S, Bengue M, Hamel R, et al. Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. *PLoS One* 2018;13. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0206093>.

Duarte T, Da Cruz IBM, Barbisan F, Capelleto D, Moresco RN, Duarte MMMF. The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytics blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-dependent gene polymorphism. *The Pharmacogenomics Journal* 2016 16:6 2016;16:501–6. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.91>.

Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 2009;360:2536–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0805715>.

Endo A, Beppu T. A historical perspective on the discovery of statins. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 2010;86:484–93. <https://doi.org/10.2183/PJAB.86.484>.

Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, AND ML-236C, NEW INHIBITORS OF CHOLESTEROGENESIS PRODUCED BY PENICILLIUM CITRINUM. J Antibiot (Tokyo) 1976;29:1346–8. <https://doi.org/10.7164/ANTIBIOTICS.29.1346>.

Españó E, Nam JH, Song EJ, Song D, Lee CK, Kim JK. Lipophilic statins inhibit Zika virus production in Vero cells. Sci Rep 2019;9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47956-1>.

Famer D, Wahlund LO, Crisby M. Rosuvastatin reduces microglia in the brain of wild type and ApoE knockout mice on a high cholesterol diet; Implications for prevention of stroke and AD. Biochem Biophys Res Commun 2010;402:367–72. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.10.035>.

FDA Drug Safety Communication: Important safety label changes to cholesterol-lowering statin drugs | FDA. n.d. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-important-safety-label-changes-cholesterol-lowering-statin-drugs> (accessed February 22, 2025).

Foo J, Bellot G, Pervaiz S, Alonso S. Mitochondria-mediated oxidative stress during viral infection. Trends Microbiol 2022;30:679–92. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2021.12.011/ASSET/111C479A-4FFC-4848-9340-646D864E90AB/MAIN.ASSETS/GR2.JPG>.

Fünfschilling U, Jockusch WJ, Sivakumar N, Möbius W, Corthals K, Li S, et al. Critical Time Window of Neuronal Cholesterol Synthesis during Neurite Outgrowth. Journal of Neuroscience 2012;32:7632–45. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1352-11.2012>.

Gao B, Vavricka SR, Meier PJ, Stieger B. Differential cellular expression of organic anion transporting peptides OATP1A2 and OATP2B1 in the human retina and brain: implications for carrier-mediated transport of neuropeptides and neurosteroids in the CNS. Pflugers Arch 2015;467:1481–93. <https://doi.org/10.1007/S00424-014-1596-X>.

Garber C, Soung A, Vollmer LL, Kanmogne M, Last A, Brown J, et al. T cells promote microglia-mediated synaptic elimination and cognitive dysfunction during recovery from neuropathogenic flaviviruses. Nature Neuroscience 2019 22:8 2019;22:1276–88. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0427-y>.

Garcia-Mesa Y, Jay TR, Checkley MA, Luttge B, Dobrowolski C, Valadkhan S, et al. Immortalization of primary microglia: a new platform to study HIV regulation in the central nervous system. *J Neurovirol* 2016;23:47. <https://doi.org/10.1007/S13365-016-0499-3>.

Gober R, Ardalan M, Shiadeh SMJ, Duque L, Garamszegi SP, Ascona M, et al. Microglia activation in postmortem brains with schizophrenia demonstrates distinct morphological changes between brain regions. *Brain Pathol* 2022;32. <https://doi.org/10.1111/BPA.13003>.

Goellner S, Enkavi G, Prasad V, Denolly S, Eu S, Mizzon G, et al. Zika virus prM protein contains cholesterol binding motifs required for virus entry and assembly. *Nature Communications* 2023 14:1 2023;14:1–20. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42985-x>.

Golomb BA, McGraw JJ, Evans MA, Dimsdale JE. Physician response to patient reports of adverse drug effects: Implications for patient-targeted adverse effect surveillance. *Drug Saf* 2007;30:669–75. <https://doi.org/10.2165/00002018-200730080-00003/METRICS>.

Gómez-Huelgas R, Javaheri A, Pedro-Botet J, Climent E, Benaiges D. Hydrophilic or Lipophilic Statins? *Front Cardiovasc Med* 2021;8:687585. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2021.687585>.

Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 1998;83:490–500. <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.5.490>.

Gullberg RC, Jordan Steel J, Moon SL, Soltani E, Geiss BJ. Oxidative stress influences positive strand RNA virus genome synthesis and capping. *Virology* 2015;475:219–29. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2014.10.037>.

Gupta S, Ellis SE, Ashar FN, Moes A, Bader JS, Zhan J, et al. Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nature Communications* 2014 5:1 2014;5:1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms6748>.

GW D, SF K, AJ H. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952;46:509–20. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).

Haas RH, Zolkipli Z. Mitochondrial disorders affecting the nervous system. *Semin Neurol* 2014;34:321–40. <https://doi.org/10.1055/S-0034-1386770/ID/JR00941-21/BIB>.

Hackett BA, Cherry S. Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:4246–51. https://doi.org/10.1073/PNAS.1720032115/SUPPL_FILE/PNAS.1720032115.SAPP.PDF.

Hammack C, Ogden SC, Madden JC, Medina A, Xu C, Phillips E, et al. Zika Virus Infection Induces DNA Damage Response in Human Neural Progenitors That Enhances Viral Replication. *J Virol* 2019;93. <https://doi.org/10.1128/JVI.00638-19>.

Hanai J, Cao P, Tanksale P, Imamura S, Koshimizu E, Zhao J, et al. The muscle-specific ubiquitin ligase atrogin-1/MAFbx mediates statin-induced muscle toxicity. *J Clin Invest* 2007;117. <https://doi.org/10.1172/JCI32741>.

Hansen D V., Hanson JE, Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 2018;217:459–72. <https://doi.org/10.1083/JCB.201709069>.

Harris E. Brain Inflammation May Underlie Neuropsychiatric Symptoms of Dementia. *JAMA* 2024;331:190–190. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2023.25768>.

Haslund-Vinding J, McBean G, Jaquet V, Vilhardt F. NADPH oxidases in oxidant production by microglia: activating receptors, pharmacology and association with disease. *Br J Pharmacol* 2016;174:1733. <https://doi.org/10.1111/BPH.13425>.

Hati S, Bhattacharyya S. Impact of Thiol-Disulfide Balance on the Binding of Covid-19 Spike Protein with Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor. *ACS Omega* 2020;5:16292–8. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.0C02125/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AO0C02125_M006.GIF.

He WB, Ko HTK, Curtis AJ, Zoungas S, Woods RL, Tonkin A, et al. The Effects of Statins on Cardiovascular and Inflammatory Biomarkers in Primary Prevention: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Heart Lung Circ* 2023;32:938–48. <https://doi.org/10.1016/J.HLC.2023.04.300>.

Heaton NS, Perera R, Berger KL, Khadka S, LaCount DJ, Kuhn RJ, et al. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication

and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:17345–50. https://doi.org/10.1073/PNAS.1010811107/SUPPL_FILE/PNAS.201010811SI.PDF.

Hehner J, Schneider L, Woitalla A, Ott B, Vu KCT, Schöbel A, et al. Glycerophospholipid remodeling is critical for orthoflavivirus infection. *Nat Commun* 2024;15:8683. <https://doi.org/10.1038/S41467-024-52979-Y>.

Heinke L. Mitochondrial ROS drive cell cycle progression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2022 23:9 2022;23:581–581. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00523-5>.

Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65:55–8. <https://doi.org/10.15585/MMWR.MM6503E1>.

Hofman A, Ott A, Breteler MMB, Bots ML, Slieter AJC, Van Harskamp F, et al. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 1997;349:151–4. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)09328-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)09328-2).

Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* (1979) 2001;292:1160–4. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1059344>.

Janelidze S, Mattsson N, Stomrud E, Lindberg O, Palmqvist S, Zetterberg H, et al. CSF biomarkers of neuroinflammation and cerebrovascular dysfunction in early Alzheimer disease. *Neurology* 2018;91:e867–77. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006082/ASSET/59C5C4BA-1AC9-4678-AAB4-1D9AA844177D/ASSETS/GRAPHIC/12FF3.JPEG>.

Jarc E, Petan T. A twist of FATE: Lipid droplets and inflammatory lipid mediators. *Biochimie* 2020;169:69–87. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2019.11.016>.

Jarc E, Petan T. Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *Yale J Biol Med* 2019.

Johnson-Anuna LN, Eckert GP, Keller JH, Igbavboa U, Franke C, Fechner T, et al. Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:786–93. <https://doi.org/10.1124/JPET.104.075028>.

Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* 2009;158:693. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2009.00430.X>.

Kata D, Földesi I, Feher LZ, Hackler L, Puskas LG, Gulya K. Rosuvastatin enhances anti-inflammatory and inhibits pro-inflammatory functions in cultured microglial cells. *Neuroscience* 2016;314:47–63. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.11.053>.

Katsiki N, Tziomalos K, Chatzizisis Y, Elisaf M, Hatzitolios AI. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on vascular cell apoptosis: beneficial or detrimental? *Atherosclerosis* 2010;211:9–14. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2009.12.028>.

Kipinoinen T, Toppala S, Rinne JO, Viitanen MH, Jula AM, Ekblad LL. Association of Midlife Inflammatory Markers with Cognitive Performance at 10-Year Follow-up. *Neurology* 2022;99:E2294–302. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000201116/ASSET/F973ADF3-72AB-4DC3-B2F4-67327F27F1B6/ASSETS/GRAPHIC/13TTU1.JPEG>.

Kleber de Oliveira W, Cortez-Escalante J, De Oliveira WTGH, do Carmo GMI, Henriques CMP, Coelho GE, et al. Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy — Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2019;65. <https://doi.org/10.15585/MMWR.MM6509E2ER>.

Klein S, Golani G, Lolicato F, Lahr C, Beyer D, Herrmann A, et al. IFITM3 blocks influenza virus entry by sorting lipids and stabilizing hemifusion. *Cell Host Microbe* 2023;31:616–633.e20. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2023.03.005>.

Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, Spiekermann S, Kirchhoff N, Schulz S, et al. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation* 2005;111:2356–63. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000164260.82417.3F>.

Larsen S, Stride N, Hey-Mogensen M, Hansen CN, Bang LE, Bundgaard H, et al. Simvastatin Effects on Skeletal Muscle: Relation to Decreased Mitochondrial Function and Glucose Intolerance. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:44–53. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2012.09.036>.

de Laval F, d'Aubigny H, Mathéus S, Labrousse T, Ensargueix AL, Lorenzi EM, et al. Evolution of symptoms and quality of life during Zika virus infection: A 1-year prospective cohort study. *Journal of Clinical Virology* 2018;109:57–62. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2018.09.015>.

Layerenza JP, González P, García De Bravo MM, Polo MP, Sisti MS, Ves-Losada A. Nuclear lipid droplets: A novel nuclear domain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2013;1831:327–40. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2012.10.005>.

Lazear HM, Diamond MS. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere 2016. <https://doi.org/10.1128/JVI.00252-16>.

Ledur PF, Karmirian K, Pedrosa C da SG, Souza LRQ, Assis-de-Lemos G, Martins TM, et al. Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. *Sci Rep* 2020;10. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-57914-X>.

Lee C-J, Lin H-R, Liao C-L, Lin Y-L. Cholesterol Effectively Blocks Entry of Flavivirus. *J Virol* 2008a;82:6470–80. <https://doi.org/10.1128/JVI.00117-08/FORMAT/EPUB>.

Lee C-J, Lin H-R, Liao C-L, Lin Y-L. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. *J Virol* 2008b;82:6470–80. <https://doi.org/10.1128/JVI.00117-08>.

Li C, Deng YQ, Wang S, Ma F, Aliyari R, Huang XY, et al. 25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model. *Immunity* 2017;46:446–56. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.012>.

Li Y, Munoz-Mayorga D, Nie Y, Kang N, Tao Y, Lagerwall J, et al. Microglial lipid droplet accumulation in tauopathy brain is regulated by neuronal AMPK. *Cell Metab* 2024;36:1351-1370.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2024.03.014>.

Liang Y, Dai X. The global incidence and trends of three common flavivirus infections (Dengue, yellow fever, and Zika) from 2011 to 2021. *Front Microbiol* 2024;15:1458166. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1458166/BIBTEX>.

Liao JK. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *Journal of Clinical Investigation* 2002;110:285–8. <https://doi.org/10.1172/JCI16421>.

Liefhebber JMP, Hague C V., Zhang Q, Wakelam MJO, McLauchlan J. Modulation of triglyceride and cholesterol ester synthesis impairs assembly of infectious hepatitis C virus. *J Biol Chem* 2014;289:21276–88. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.582999>.

Lim T, Rajoriya S, Kim B, Natasha A, Im H, Shim HS, et al. In vitro broad-spectrum antiviral activity of MIT-001, a mitochondria-targeted reactive oxygen species scavenger, against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and multiple zoonotic viruses. *Virus Res* 2024;342. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2024.199325>.

Lindberg C, Crisby M, Winblad B, Schultzberg M. Effects of statins on microglia. *J Neurosci Res* 2005;82:10–9. <https://doi.org/10.1002/JNR.20615>.

Lotta G, Nunes J. COVID-19 and health promotion in Brazil: community health workers between vulnerability and resistance. 2021;29:14–22. <https://doi.org/10.1177/17579759211012375>.

Lu W, Shi L, Gao J, Zhu H, Hua Y, Cai J, et al. Piperlongumine Inhibits Zika Virus Replication In vitro and Promotes Up-Regulation of HO-1 Expression, Suggesting An Implication of Oxidative Stress. *Virol Sin* 2021;36:510–20. <https://doi.org/10.1007/S12250-020-00310-6>.

Macedo RCR. Uso de estatinas nos Sistemas Públicos de Saúde do Brasil e da Escócia: achados e implicações 2018.

Mackenzie JM, Khromykh AA, Parton RG. Cholesterol Manipulation by West Nile Virus Perturbs the Cellular Immune Response. *Cell Host Microbe* 2007;2:229–39. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2007.09.003>.

Manet C, Mansuroglu Z, Conquet L, Bortolin V, Comptdaer T, Segrt H, et al. Zika virus infection of mature neurons from immunocompetent mice generates a disease-associated microglia and a tauopathy-like phenotype in link with a delayed interferon beta response. *J Neuroinflammation* 2022;19. <https://doi.org/10.1186/S12974-022-02668-8>.

Marakasova ES, Eisenhaber B, Maurer-Stroh S, Eisenhaber F, Baranova A. Prenylation of viral proteins by enzymes of the host: Virus-driven rationale for therapy with statins and FT/GGT1 inhibitors. *Bioessays* 2017;39. <https://doi.org/10.1002/BIES.201700014>.

Marschallinger J, Iram T, Zardeneta M, Lee SE, Lehallier B, Haney MS, et al. Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nature Neuroscience* 2020 23:2 2020;23:194–208. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0566-1>.

Massetti T, Herrero D, Alencar J, Silva T, Moriyama C, Gehrke F, et al. Clinical characteristics of children with congenital Zika syndrome: a case series. *Arq Neuropsiquiatr* 2020;78:403–11. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20200020>.

Medigeshi GR, Hirsch AJ, Streblow DN, Nikolich-Zugich J, Nelson JA. West Nile Virus Entry Requires Cholesterol-Rich Membrane Microdomains and Is Independent of $\alpha v \beta 3$ Integrin. *J Virol* 2008;82:5212–9. https://doi.org/10.1128/JVI.00008-08/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTARY_INFORMATION.PDF.

Mekhora C, Lamport DJ, Spencer JPE. An overview of the relationship between inflammation and cognitive function in humans, molecular pathways and the impact of nutraceuticals. *Neurochem Int* 2024;181:105900. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2024.105900>.

Michaeli DT, Michaeli JC, Albers · Sebastian, Tobias Boch ·, Michaeli T. Established and Emerging Lipid-Lowering Drugs for Primary and Secondary Cardiovascular Prevention. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 123AD;23:477–95. <https://doi.org/10.1007/s40256-023-00594-5>.

Milajerdi A, Sadeghi A, Mousavi SM, Larijani B, Esmailzadeh A. Influence of Statins on Circulating Inflammatory Cytokines in Patients With Abnormal Glucose Homeostasis: A Meta-analysis of Data From Randomized Controlled Trials. *Clin Ther* 2020;42:e13–31. <https://doi.org/10.1016/J.CLINTHERA.2019.12.009>.

Miner JJ, Diamond MS. Zika virus pathogenesis and tissue tropism n.d. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>.

Moesker B, Rodenhuis-Zybert IA, Meijerhof T, Wilschut J, Smit JM. Characterization of the functional requirements of West Nile virus membrane fusion. *Journal of General Virology* 2010;91:389–93. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.015255-0/CITE/REFWORKS>.

Moon GJ, Kim SJ, Cho YH, Ryoo S, Bang OY. Antioxidant Effects of Statins in Patients with Atherosclerotic Cerebrovascular Disease. *J Clin Neurol* 2014;10:140. <https://doi.org/10.3988/JCN.2014.10.2.140>.

Morgan JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, et al. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol Psychiatry* 2010;68:368–76. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2010.05.024>.

Mouritsen OG, Zuckermann MJ. What's so special about cholesterol? *Lipids* 2004;39:1101–13. <https://doi.org/10.1007/S11745-004-1336-X>.

Moutinho M, Nunes MJ, Rodrigues E. The mevalonate pathway in neurons: It's not just about cholesterol. *Exp Cell Res* 2017;360:55–60. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2017.02.034>.

Muldoon MF, Barger SD, Ryan CM, Flory JD, Lehoczy JP, Matthews KA, et al. Effects of lovastatin on cognitive function and psychological well-being. *Am J Med* 2000;108:538–46. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00353-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00353-3).

Muldoon MF, Ryan CM, Sereika SM, Flory JD, Manuck SB. Randomized trial of the effects of simvastatin on cognitive functioning in hypercholesterolemic adults. *Am J Med* 2004;117:823–9. <https://doi.org/10.1016/J.AMJMED.2004.07.041>.

Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect* 2014a;20:O595–6. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12707>.

Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection* 2014b;20:O595–6. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12707>.

Newton CJ, Xie YX, Burgoyne CH, Adams I, Atkin SL, Abidia A, et al. Fluvastatin Induces Apoptosis of Vascular Endothelial Cells: Blockade by Glucocorticoids. [Http://DxDoiOrg/101177/096721090301100110](http://DxDoiOrg/101177/096721090301100110) 2003;11:52–60. <https://doi.org/10.1177/096721090301100110>.

Niranjan R, Murugasamy V, Sunilkumar A, Manoj H, Ganesh K, Vidhyapriya P, et al. Atorvastatin attenuates NS1 (Non-structural protein-1) of dengue type-2 serotype-induced expressions of matrix metalloproteinases in HL-60 cells, differentiated to neutrophils: Implications for the immunopathogenesis of dengue viral disease. *Int Immunopharmacol* 2022;112:109082. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2022.109082>.

Nishimura T, Kouwaki T, Takashima K, Ochi A, Mtali YS, Oshiumi H. Cholesterol restriction primes antiviral innate immunity via SREBP1-driven noncanonical type I IFNs. *EMBO Rep* 2024. https://doi.org/10.1038/S44319-024-00346-9/SUPPL_FILE/44319_2024_346_MOESM9_ESM.PDF.

Nowak MM, Niemczyk M, Florczyk M, Kurzyna M, Pączek L. Effect of Statins on All-Cause Mortality in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Propensity Score-Matched Studies. *J Clin Med* 2022;11:5643. <https://doi.org/10.3390/JCM11195643>.

Oka S, Tsuzuki T, Hidaka M, Ohno M, Nakatsu Y, Sekiguchi M. Endogenous ROS production in early differentiation state suppresses endoderm differentiation via transient FOXC1 expression. *Cell Death Discovery* 2022 8:1 2022;8:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00961-2>.

Okamoto H, Koizumi K, Kamitsuji S, Inoue E, Hara M, Tomatsu T, et al. Beneficial action of statins in patients with rheumatoid arthritis in a large observational cohort. *J Rheumatol* 2007;34.

Oliveira FBC de, Freire VPAS de S, Coelho SVA, Meuren LM, Palmeira J da F, Cardoso AL, et al. ZIKV Strains Elicit Different Inflammatory and Anti-Viral Responses in Microglia Cells. *Viruses* 2023;15:1250. <https://doi.org/10.3390/V15061250>.

de Oliveira GMM, Brant LCC, Polanczyk CA, Malta DC, Biolo A, Nascimento BR, et al. Estatística Cardiovascular – Brasil 2023. *Arq Bras Cardiol* 2024;121:e20240079. <https://doi.org/10.36660/ABC.20240079>.

Olmastroni E, Molari G, De Beni N, Colpani O, Galimberti F, Gazzotti M, et al. Statin use and risk of dementia or Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Eur J Prev Cardiol* 2022;29:804–14. <https://doi.org/10.1093/EURJPC/ZWAB208>.

Padala S, Thompson PD. Statins as a possible cause of inflammatory and necrotizing myopathies. *Atherosclerosis* 2012;222:15–21. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2011.11.005>.

Päivä H, Thelen KM, Van Coster R, Smet J, De Paepe B, Mattila KM, et al. High-dose statins and skeletal muscle metabolism in humans: A randomized, controlled trial. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78:60–8. <https://doi.org/10.1016/J.CLPT.2005.03.006>.

Penson PE, Pirro M, Banach M. LDL-C: Lower is better for longer - Even at low risk. *BMC Med* 2020;18:1–6. <https://doi.org/10.1186/S12916-020-01792-7/FIGURES/1>.

Pereira SH, Almeida LT, Ferraz AC, Ladeira M de S, Ladeira LO, Magalhães CL de B, et al. Antioxidant and antiviral activity of fullerol against Zika virus. *Acta Trop* 2021;224. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2021.106135>.

Perera R, Riley C, Isaac G, Hopf-Jannasch AS, Moore RJ, Weitz KW, et al. Dengue Virus Infection Perturbs Lipid Homeostasis in Infected Mosquito Cells. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002584. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1002584>.

Phelps NH, Singleton RK, Zhou B, Heap RA, Mishra A, Bennett JE, et al. Worldwide trends in underweight and obesity from 1990 to 2022: a pooled analysis of 3663 population-representative studies with 222 million children, adolescents, and adults. *The Lancet* 2024;403:1027–50. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02750-2/ATTACHMENT/BE7B68CC-C322-40F3-ACBF-7A9CEC1D0A80/MMC1.PDF](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02750-2/ATTACHMENT/BE7B68CC-C322-40F3-ACBF-7A9CEC1D0A80/MMC1.PDF).

Van Der Putten C, Kuipers HF, Zuiderwijk-Sick EA, Van Straalen L, Kondova I, Van Den Elsen PJ, et al. Statins amplify TLR-induced responses in microglia via inhibition of cholesterol biosynthesis. *Glia* 2012;60:43–52. <https://doi.org/10.1002/GLIA.21245>.

Qiao L, Han X, Ding R, Shang X, Xiao L, Gao G, et al. Npc1 deficiency impairs microglia function via TREM2-mTOR signaling in Niemann-Pick disease type C. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2024;1870. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2024.167478>.

Qu H, Guo M, Chai H, Wang WT, Ga ZY, Shi DZ. Effects of coenzyme Q10 on statin-induced myopathy: An updated meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Heart Assoc* 2018;7. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.009835/ASSET/540AD682-E69F-4346-8C1E-E000FF52E651/ASSETS/GRAPHIC/JAH33514-FIG-0010.PNG>.

Raghuraman R, Karthikeyan A, Wei WL, Dheen ST, Sajikumar S. Activation of microglia in acute hippocampal slices affects activity-dependent long-term potentiation and synaptic tagging and capture in area CA1. *Neurobiol Learn Mem* 2019;163. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2019.107039>.

Rankin JA. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues* 2004;15:3–17. <https://doi.org/10.1097/00044067-200401000-00002>.

Raper J, Kovacs-Balint Z, Mavigner M, Gumber S, Burke MW, Habib J, et al. Long-term alterations in brain and behavior after postnatal Zika virus infection in infant macaques. *Nature Communications* 2020 11:1 2020;11:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16320-7>.

Renner M, Dejnirattisai W, Carrique L, Martin IS, Karia D, Ilca SL, et al. Flavivirus maturation leads to the formation of an occupied lipid pocket in the surface glycoproteins. *Nature Communications* 2021 12:1 2021;12:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21505-9>.

Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA021993>.

Saba ES, Karout M, Nasralla L, Kobeissy F, Darwish H, Khoury SJ. Long-term cognitive deficits after traumatic brain injury associated with microglia activation. *Clinical Immunology* 2021;230:108815. <https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2021.108815>.

Sahebzamani FM, Munro CL, Marroquin OC, Diamond DM, Keller E, Kip KE. Examination of the FDA Warning for Statins and Cognitive Dysfunction 2014. <https://doi.org/10.4172/2329-6887.1000141>.

Saheki A, Terasaki T, Tamai I, Tsuji A. In Vivo and in Vitro Blood–Brain Barrier Transport of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) Reductase Inhibitors. *Pharmaceutical Research* 1994 11:2 1994;11:305–11. <https://doi.org/10.1023/A:1018975928974>.

Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature Medicine* 2017 23:9 2017;23:1018–27. <https://doi.org/10.1038/nm.4397>.

Sander WJ, Fourie C, Sabiu S, O'Neill FH, Pohl CH, O'Neill HG. Reactive oxygen species as potential antiviral targets. *Rev Med Virol* 2022;32. <https://doi.org/10.1002/RMV.2240>.

Schäfer AM, Meyer Zu Schwabedissen HE, Bien-Möller S, Hubeny A, Vogelgesang S, Oswald S, et al. OATP1A2 and OATP2B1 Are Interacting with Dopamine-Receptor Agonists and Antagonists. *Mol Pharm* 2020;17:1987–95. https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.0C00159/ASSET/IMAGES/MEDIUM/MP0C00159_0009.GIF.

Scheiffele P, Rietveld A, Wilk T, Simons K. Influenza Viruses Select Ordered Lipid Domains during Budding from the Plasma Membrane. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:2038–44. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.4.2038>.

Schöbel A, Pinho dos Reis V, Burkhard R, Hehner J, Schneider L, Schauflinger M, et al. Inhibition of sterol O-acyltransferase 1 blocks Zika virus infection in cell lines and cerebral organoids. *Communications Biology* 2024 7:1 2024;7:1–18. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06776-4>.

Screaton G, Culshaw A, Mongkolsapaya J. The immunology of Zika Virus. *F1000Res* 2018;7:203. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.12271.1>.

Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente Ministério da Saúde. n.d.

Sekar A, Bialas AR, De Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N, et al. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 2016 530:7589 2016;530:177–83. <https://doi.org/10.1038/nature16549>.

Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2017 18:6 2017;18:361–74. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>.

Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH. Maternal Influenza Infection Causes Marked Behavioral and Pharmacological Changes in the Offspring. *Journal of Neuroscience* 2003;23:297–302. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-01-00297.2003>.

Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ, Fu X, Penn MS, Sprecher DL, et al. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation* 2003a;108:426–31. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000080895.05158.8B>.

Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ, Fu X, Penn MS, Sprecher DL, et al. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation* 2003b;108:426–31. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000080895.05158.8B>.

Shukla A, Rastogi M, Singh SK. Zika virus NS1 suppresses the innate immune responses via miR-146a in human microglial cells. *Int J Biol Macromol* 2021;193:2290–6. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.11.061>.

Sierra S, Ramos MC, Molina P, Esteo C, Vázquez JA, Burgos JS. Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood-brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death. *J Alzheimers Dis* 2011;23:307–18. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101179>.

Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 21:7 2020;21:363–83. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>.

Silva MM, Rodrigues MS, Paploski IA, Kikuti Mariana, Kasper AM, Cruz JS, et al. Accuracy of Dengue Reporting by National Surveillance System, Brazil - Volume 22, Number 2—February 2016 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC*. *Emerg Infect Dis* 2016;22:336–9. <https://doi.org/10.3201/EID2202.150495>.

Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae ICTV VIRUS TAXONOMY PROFILES. *Journal of General Virology* 2017;98:2–3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>.

Singh PK, Khatri I, Jha A, Pretto CD, Spindler KR, Arumugaswami V, et al. Determination of system level alterations in host transcriptome due to Zika virus (ZIKV) Infection in retinal pigment epithelium. *Scientific Reports* 2018 8:1 2018;8:1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29329-2>.

Singh S, Wright RE, Giri S, Arumugaswami V, Kumar A. Targeting ABCG1 and SREBP-2 mediated cholesterol homeostasis ameliorates Zika virus-induced ocular pathology. *IScience* 2024;27. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2024.109088>.

Singhvi S, Pan H, Morrison R, Willard D. Disposition of pravastatin sodium, a tissue-selective HMG-CoA reductase inhibitor, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1990;29:239–43. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2125.1990.TB03626.X>.

Soto-Acosta R, Mosso C, Cervantes-Salazar M, Puerta-Guardo H, Medina F, Favari L, et al. The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. *Virology* 2013a;442:132–47. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2013.04.003>.

Soto-Acosta R, Mosso C, Cervantes-Salazar M, Puerta-Guardo H, Medina F, Favari L, et al. The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection

correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. *Virology* 2013b;442:132–47. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2013.04.003>.

Spooner R, Yilmaz Ö. The Role of Reactive-Oxygen-Species in Microbial Persistence and Inflammation. *Int J Mol Sci* 2011;12:334. <https://doi.org/10.3390/IJMS12010334>.

Stoyanova G, Jabeen S, Landazuri Vinueza J, Ghosh Roy S, Lockshin St John R, Zakeri Z, et al. Zika Virus triggers autophagy to exploit host lipid metabolism and drive viral replication 2022. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2196572/v1>.

Tang D, Kang R, Berghe T Vanden, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research* 2019 29:5 2019;29:347–64. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>.

Tang XL, Yu JW, Geng YH, Wang JR, Zheng RC, Zheng YG. From Discovery to Mass Production: A Perspective on Bio-Manufacturing Exemplified by the Development of Statins. *Engineering* 2023;24:138–50. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2022.04.030>.

Teixeira L, Temerozo JR, Pereira-Dutra FS, Ferreira AC, Mattos M, Gonçalves BS, et al. Simvastatin Downregulates the SARS-CoV-2-Induced Inflammatory Response and Impairs Viral Infection Through Disruption of Lipid Rafts. *Front Immunol* 2022a;13. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.820131>.

Teixeira L, Temerozo JR, Pereira-Dutra FS, Ferreira AC, Mattos M, Gonçalves BS, et al. Simvastatin Downregulates the SARS-CoV-2-Induced Inflammatory Response and Impairs Viral Infection Through Disruption of Lipid Rafts. *Front Immunol* 2022b;13:820131. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.820131/BIBTEX>.

Thelen KM, Rentsch KM, Gutteck U, Heverin M, Olin M, Andersson U, et al. Brain cholesterol synthesis in mice is affected by high dose of simvastatin but not of pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:1146–52. <https://doi.org/10.1124/JPET.105.094136>.

Thompson PD, Panza G, Zaleski A, Taylor B. Statin-Associated Side Effects. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:2395–410. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2016.02.071>.

Tiffany JM, Blough HA. Models of Structure of the Envelope of Influenza Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970;65:1105. <https://doi.org/10.1073/PNAS.65.4.1105>.

Trambowicz K, Staciwa M, Broncel M, Gorzelak-Pabiś P. The effect of statins intake on sleep quality. *Journal of Health Inequalities* 2023;9:217–23. <https://doi.org/10.5114/JHI.2023.131805>.

Tremblay MĚ, Lowery RL, Majewska AK. Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biol* 2010;8:e1000527. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000527>.

Tse FLS, Jaffe JM, Troendle A. Pharmacokinetics of fluvastatin after single and multiple doses in normal volunteers. *J Clin Pharmacol* 1992;32:630–8. <https://doi.org/10.1002/J.1552-4604.1992.TB05773.X>.

Vainchtein ID, Chin G, Cho FS, Kelley KW, Miller JG, Chien EC, et al. Astrocyte-derived interleukin-33 promotes microglial synapse engulfment and neural circuit development. *Science* (1979) 2018;359:1269–73. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAL3589/SUPPL_FILE/AAL3589_VAINCHTEIN_SM.PDF.

Vamvakopoulos JE, Green C. HMG-CoA reductase inhibition aborts functional differentiation and triggers apoptosis in cultured primary human monocytes: a potential mechanism of statin-mediated vasculoprotection 2003.

Vancini RL, Andrade MS, de Lira CAB. Dengue's economic impact in Brazil. *Science* (1979) 2024;385:266. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ADP3202>.

Vandermeer ML, Thomas AR, Kamimoto L, Reingold A, Gershman K, Meek J, et al. Association between use of statins and mortality among patients hospitalized with laboratory-confirmed influenza virus infections: a multistate study. *J Infect Dis* 2012;205:13–9. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIR695>.

Vega GL, Weiner MF, Lipton AM, Von Bergmann K, Lütjohann D, Moore C, et al. Reduction in levels of 24S-hydroxycholesterol by statin treatment in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2003;60:510–5. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.60.4.510>.

Vergne-Salle P, Bertin P. Chronic pain and neuroinflammation. *Joint Bone Spine* 2021;88:105222. <https://doi.org/10.1016/J.JBSPIN.2021.105222>.

Vinnakota JM, Adams RC, Athanassopoulos D, Schmidt D, Biavasco F, Zähringer A, et al. Anti-PD-1 cancer immunotherapy induces central nervous system immune-related adverse events by microglia activation. *Sci Transl Med* 2024;16. https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ADJ9672/SUPPL_FILE/SCITRANSLMED.ADJ9672_MDAR_REPRODUCIBILITY_CHECKLIST.PDF.

Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, et al. Interleukin-1 β Enhances NMDA Receptor-Mediated Intracellular Calcium Increase through Activation of the Src Family of Kinases. *Journal of Neuroscience* 2003;23:8692–700. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003>.

Vural K, Tuglu MI. Neurotoxic effect of statins on mouse neuroblastoma NB2a cell line. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011;15:985–91.

Wagstaff LR, Mitton MW, Arvik BML, Doraiswamy PM. Statin-associated memory loss: Analysis of 60 case reports and review of the literature. *Pharmacotherapy* 2003;23:871–80. <https://doi.org/10.1592/phco.23.7.871.32720>.

Wang C, Gale M, Keller BC, Huang H, Brown MS, Goldstein JL, et al. Identification of FBL2 as a geranylgeranylated cellular protein required for hepatitis C virus RNA replication. *Mol Cell* 2005;18:425–34. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.004>.

Wang D-S, Zurek AA, Lecker I, Yu J, Abramian AM, Avramescu S, et al. Memory Deficits Induced by Inflammation Are Regulated by α 5-Subunit-Containing GABAA Receptors. *CellReports* 2012;2:488–96. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.022>.

Wang H, Chen Yun, Li P, Chen Yan, Yu D, Tan Q, et al. Biphasic effects of statins on neuron cell functions under oxygen–glucose deprivation and normal culturing conditions via different mechanisms. *Pharmacol Res Perspect* 2022;10:e01001. <https://doi.org/10.1002/PRP2.1001>.

Wang Y, Fu WY, Cheung K, Hung KW, Chen C, Geng H, et al. Astrocyte-secreted IL-33 mediates homeostatic synaptic plasticity in the adult hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021;118:e2020810118. https://doi.org/10.1073/PNAS.2020810118/SUPPL_FILE/PNAS.2020810118.SD02.XLSX.

Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Baurmer AT, et al. Cellular Antioxidant Effects of Atorvastatin In Vitro and In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:300–5. <https://doi.org/10.1161/HQ0202.104081>.

Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res* 2016;130:69–80. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2016.03.010>.

Wei G, Xue L, Zhu Y, Qian X, Zou L, Jin Q, et al. Differences in susceptibility of HT-29 and A549 cells to statin-induced toxicity: An investigation using high content screening. *J Biochem Mol Toxicol* 2021;35. <https://doi.org/10.1002/JBT.22699>.

Wei Y, Yang L, Pandeya A, Cui J, Zhang Y, Li Z. Pyroptosis-Induced Inflammation and Tissue Damage. *J Mol Biol* 2022;434. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2021.167301>.

Wheeler AC, Toth D, Ridenour T, Lima Nóbrega L, Borba Firmino R, Marques Da Silva C, et al. Developmental Outcomes Among Young Children With Congenital Zika Syndrome in Brazil. *JAMA Netw Open* 2020;3:e204096. <https://doi.org/10.1001/JAMANETWORKOPEN.2020.4096>.

Wieland J, Frey S, Rupp U, Essbauer S, Groß R, Münch J, et al. Zika virus replication in glioblastoma cells: electron microscopic tomography shows 3D arrangement of endoplasmic reticulum, replication organelles, and viral ribonucleoproteins. *Histochem Cell Biol* 2021;156:527–38. <https://doi.org/10.1007/S00418-021-02028-2/FIGURES/6>.

Wilhelmina Van Leur S, Heunis T, Munnur D, Sanyal S. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence* 2021;12. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996059>.

Williams D, Feely J. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Drug Interactions with HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics* 2002 41:5 2012;41:343–70. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241050-00003>.

Woodburn SC, Bollinger JL, Wohleb ES. The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress. *Journal of Neuroinflammation* 2021 18:1 2021;18:1–16. <https://doi.org/10.1186/S12974-021-02309-6>.

Wu BR, Chen DH, Liao WC, Ho WC, Yin MC, Lin CL, et al. Statin Therapy and the Risk of Viral Infection: A Retrospective Population-Based Cohort Study. *J Clin Med* 2022;11:5626. <https://doi.org/10.3390/JCM11195626/S1>.

Xie J, Van Hoecke L, Vandenbroucke RE. The Impact of Systemic Inflammation on Alzheimer's Disease Pathology. *Front Immunol* 2022;12:796867. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.796867/PDF>.

Xu P, Shan C, Dunn TJ, Xie X, Xiaid H, Gao J, et al. Role of microglia in the dissemination of Zika virus from mother to fetal brain 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008413>.

Yamamoto A, Sudo H, Endo A. Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1980;35:259–66. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(80\)90124-0](https://doi.org/10.1016/0021-9150(80)90124-0).

Ye J, Wang C, Sumpter R, Brown MS, Goldstein JL, Gale M. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15865–70. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2237238100>.

York AG, Williams KJ, Argus JP, Reue K, Stetson DB, Correspondence SJB. Limiting Cholesterol Biosynthetic Flux Spontaneously Engages Type I IFN Signaling Accession Numbers GSE73942 York et al. *Cell* 2015;163:1716–29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.045>.

Zhang J, Xue R, Ong WY, Chen P. Roles of Cholesterol in Vesicle Fusion and Motion. *Biophys J* 2009;97:1371. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2009.06.025>.

Zhang Q, Qu H, Chen Y, Luo X, Chen C, Xiao B, et al. Atorvastatin Induces Mitochondria-Dependent Ferroptosis via the Modulation of Nrf2-xCT/GPx4 Axis. *Front Cell Dev Biol* 2022;10:806081. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2022.806081/FULL>.

Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep* 2019;9. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-42286-8>.

Zhou B, Rayner AW, Gregg EW, Sheffer KE, Carrillo-Larco RM, Bennett JE, et al. Worldwide trends in diabetes prevalence and treatment from 1990 to 2022: a pooled analysis of 1108 population-representative studies with 141 million participants. *The*

Lancet 2024;404:2077–93. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)02317-1/ATTACHMENT/EFD1F5AD-0EA4-474B-A131-0C2B6F00088B/MMC1.PDF](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)02317-1/ATTACHMENT/EFD1F5AD-0EA4-474B-A131-0C2B6F00088B/MMC1.PDF).

Zhou QD, Chi X, Lee MS, Hsieh WY, Mkrtchyan JJ, Feng AC, et al. Interferon-mediated reprogramming of membrane cholesterol to evade bacterial toxins. *Nature Immunology* 2020 21:7 2020;21:746–55. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0695-4>.

Zhou YD, Lee S, Jin Z, Wright M, Smith SEP, Anderson MP. Arrested maturation of excitatory synapses in autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 2009;15:1208–14. <https://doi.org/10.1038/NM.2019>.

Zinellu A, Mangoni AA. A systematic review and meta-analysis of the effect of statins on glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase. *Antioxidants* 2021;10:1841. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10111841/S1>.

Zipp F, Bittner S, Schafer DP. Cytokines as emerging regulators of central nervous system synapses. *Immunity* 2023;56:914–25. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2023.04.011>.

Zuckerman L, Rehavi M, Nachman R, Weiner I. Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: A novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:1778–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300248>.