

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Julia Domene Galano

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIVIRAL, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO
DE AGONISTAS DE RIG-I E TLR-3 E DA NARINGENINA NA INFECÇÃO POR
ZIKA VÍRUS**

São Paulo

2023

Julia Domene Galano – RA: 016252

**Avaliação do efeito antiviral, antioxidante e anti-inflamatório de agonistas de
RIG-I e TLR-3 e da naringenina na infecção por Zika Vírus**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Ronni Rômulo Novaes e Brito e coorientado pela Dra. Luana de Mendonça Oliveira, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina

São Paulo

2023

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Galano, Julia Domene
Avaliação do efeito antiviral, antioxidante e anti-inflamatório de agonistas de RIG-I e TLR-3 e da naringenina na infecção por Zika Vírus / Julia Domene Galano. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023.
49 p.

Orientação de Ronni Rômulo Novaes e Brito.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2023.

1. 1. Fatores de restrição antivirais 2. Flavanonas 3. Proteína DEAD-box 58 4. Receptor 3 Toll-Like 5. Zika virus I. Brito, Ronni Rômulo Novaes e II. Centro Universitário São Camilo III. Título

2.

3. CDD: 614.59

AGRADECIMENTOS

Agradeço todo corpo docente do Centro Universitário São Camilo pela dedicação e amor ao ensino. Ao meu professor e orientador Ronni Rômulo Novaes e Brito, pelo seu tempo e atenção com meu trabalho.

Agradeço ao LIM56 (IMT-USP), a Dra. Maria Sato e todo o grupo por terem me recebido e contribuído com minha jornada ao longo desse período. Em especial meu agradecimento a minha orientadora Luana de Mendonça Oliveira, que me deu todo apoio desde o início, por todos os aprendizados e carinho comigo, por ter me ensinado a lidar com os problemas que podem aparecer durante uma pesquisa, com persistência e calma.

Agradeço o apoio e incentivo da minha família, meus pais, como meu exemplo de profissionais da saúde, e meu irmão pelo cuidado e amor. Aos meus amigos da São Camilo que fizeram todo o processo ser mais leve e divertido.

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus que pode ser transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* e que ao longo dos anos se espalhou da África equatorial e Ásia para as ilhas do Pacífico e em 2015 atingiu as Américas do Sul e Central, causando o maior surto de ZIKV da história no Brasil. A partir desta epidemia, foi confirmada a relação entre doenças neurológicas como a microcefalia e síndrome de Guillain-Barré, e a infecção por ZIKV. Desde então, a patogênese do vírus foi estudada com objetivo de explorar possíveis medicamentos e vacinas. Já foram descritos alguns dos mecanismos de evasão do vírus pela modulação do sistema imune inato, como a ação das proteínas virais que podem degradar STAT2 e bloquear a ativação dos receptores do tipo RIG, assim desfavorecendo a resposta antiviral. Além disso, já foi descrita a capacidade do vírus de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio, o que favorece a injúria celular e piora do quadro. Pensando em diminuir esse dano tecidual é possível estudar a naringenina, um flavonoide, que já foi provada possuir efeitos benéficos ao organismo. Por isso, esse projeto tem como objetivo estudar o efeito antiviral, antioxidante e anti-inflamatório do uso de agonista de RIG-I, agonista de receptores do tipo *Toll* e da naringenina na infecção de linhagens celulares por ZIKV, e, assim expandir e contribuir com o conhecimento sobre a patogênese do vírus. A partir dos resultados dos experimentos observamos que o agonista de TLR3 aumentou a expressão dos fatores antivirais e a produção de citocinas, mas não foi capaz de inibir a morte celular induzida pela infecção de ZIKV, assim como a naringenina. Além disso, o flavonoide não modulou a produção das quimiocinas e citocinas. Mais testes precisam ser realizados para entender o real papel do agonista de TLR3 na infecção por ZIKV e da naringenina na produção de fatores antioxidantes.

Palavras-chave: Zika Vírus, RIG-I, TLR3, naringenina e fatores antivirais.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus that can be transmitted by *Aedes* mosquito, historically the virus spread from equatorial Africa and Asia to Pacific islands and in 2015 reached South and Central America, causing the biggest outbreak of ZIKV of history in Brazil. During this epidemic episode, it was confirmed the connection between neurological disorders, such as microcephaly and Guillain-Barré syndrome, and ZIKV infection. Since then, its pathogenesis has been studied to explore new medications and vaccines. It has already been described some viral mechanisms of evasion for modulation of immune system, such as STAT2 degradation and blockage of activation of RIG like receptors, by viral proteins. In addition, it has been described the virus capacity to stimulate the production of reactive oxygen species (ROS), which favors cell injury. To diminish the tissue damage, it is possible to study the naringenin, a flavonoid, that was proven to possess beneficial effects to organism. Therefore, this project aims to study the antiviral, antioxidant, and anti-inflammatory effects of the use of RIG-I agonists, Toll-like receptors agonists and naringenin against ZIKV infection in cellular lineage, to expand and contribute to knowledge about the pathogenesis of the virus. From the results of the experiments, we observed that the TLR3 agonist increased the expression of antiviral factors and the production of cytokines, but it was not able to inhibit cell death induced by ZIKV infection, as well as naringenin, in addition, the flavonoid did not modulate the production of chemokines and cytokines. More tests need to be carried out to understand the real role of the TLR3 agonist in ZIKV infection and of naringenin in the production of antioxidant factors.

Keywords: Zika virus, RIG-I, TLR3, naringenin and antiviral factors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos modos de transmissão do ZIKV e sintomas associados.....	5
Figura 2. Interferência da proteína viral NS5 na via de sinalização do ZIKV.....	8
Figura 3. Representação da via de sinalização Nrf2-Keap1-ARE.....	9
Figura 4. Cultivo da linhagem celular THP-1.....	19
Figura 5. Estratégia de análise para a citometria de fluxo	21
Figura 6. O estímulo dos agonistas de RIG-I, TLR3 e da naringenina não gerou queda significativa na viabilidade celular	23
Figura 7. RT-PCR de fatores antivirais e antioxidantes	25
Figura 8. Efeito modulador do Poly I:C LyoVec na secreção de quimiocinas e citocina Il-8, nas células THP-1	27
Figura 9. RT-PCR de fatores antivirais e antioxidantes	29
Figura 10. Padronização da infecção	31
Figura 11. Análise da viabilidade celular após o pré-tratamento e infecção por ZIKV	32
Figura 12. Produção de quimiocinas após infecção é aumentada pelo tratamento das células THP-1 com Poly I:C ou com LyoVec	34
Figura 13. Produção de citocinas das células THP-1 pré-tratadas e infectadas	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers usados na dosagem dos transcritos dos genes de fatores antivirais e antioxidantes	15
Tabela 2. Limite mínimo de detecção dos kits de CBA	16
Tabela 3. Primers e sonda usados na quantificação viral	17

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
1.1	Origem e epidemiologia	4
1.2	Transmissão e manifestação	5
1.3	Patogênese e resposta imune.....	6
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo principal	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1	Linhagem celular humana.....	13
3.2	Tratamento das linhagens celulares THP-1	13
3.3	Diferenciação da linhagem THP-1 em macrófago e tratamento	13
3.4	Infecção in vitro e tratamento	14
3.5	Avaliação da morte celular, por citometria de fluxo	14
3.6	Avaliação de mRNA por RT-PCR após tratamento	14
3.7	Dosagem de citocinas por citometria de fluxo	16
3.8	Quantificação da carga viral por RT-PCR/Taqman	16
3.9	Análise estatística	17
4	RESULTADOS.....	18
4.1	Padronização da cultura e expansão da linhagem celular THP-1	18
4.2	Análise de viabilidade celular após estímulo	20
4.3	Análise de fatores antivirais e antioxidantes por RT-PCR	23
4.4	Análise de quimiocinas e citocina por CBA	25
4.5	Comparação entre linhagem celular THP-1 e macrófagos derivados de THP-1	27
4.6	Padronização da infecção em THP-1	30
4.7	Efeito do pré-tratamento e infecção com ZIKV na viabilidade celular das células THP-1	31
4.8	Análise de quimiocinas e citocinas por CBA após pré-tratamento e infecção por ZIKV	33
5	DISCUSSÃO.....	36
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
7	CONCLUSÃO	Erro! Indicador não definido.
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Origem e epidemiologia

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus, pertencente ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviridae*, que inclui outras 52 espécies virais, como o vírus da Febre Amarela, o vírus da Dengue, o vírus do Nilo Ocidental e o vírus da encefalite de *Saint Louis*. Foi isolado pela primeira vez em 1947 em macaco rhesus na floresta Zika, localizada na Uganda, o que explica a origem do seu nome. Após um ano identificaram o vírus no mosquito *Aedes africanus*, e a confirmação do primeiro humano infectado ocorreu em 1952, por estudos sorológicos (JAVED; MANZOOR; ALI; HAQ *et al.*, 2018). Ao longo dos anos o ZIKV se espalhou da África equatorial e Ásia para as ilhas do Pacífico no fim dos anos 2000 e começo de 2010, atingindo as Américas do Sul e Central em 2015, e em 2016, a América do Norte (SONG; YUN; WOOLLEY; LEE, 2017).

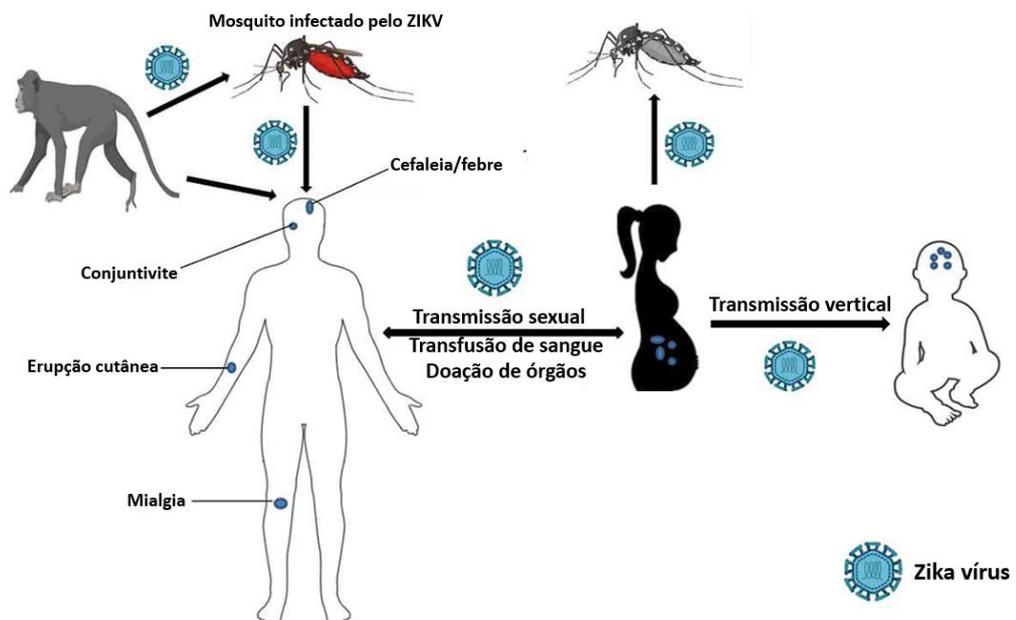
No fim de 2015, a transmissão do vírus se expandiu para pelo menos 14 estados brasileiros, com uma estimativa de 444.000 a 1.300.000 casos suspeitos, sendo o maior surto de ZIKV da história. Durante esta epidemia, foi observado aumento no número de recém-nascidos com microcefalia nas áreas afetadas, em concordância com as observações feitas nos estudos retrospectivos na Polinésia Francesa após o surto de ZIKV, entre 2013 e 2014. Ao associar a infecção a microcefalia e outras doenças neurológicas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretou Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), de fevereiro a novembro de 2016 (KINDHAUSER; ALLEN; FRANK; SANTHANA *et al.*, 2016; SONG; YUN; WOOLLEY; LEE, 2017).

O surto da doença no Brasil, foi inicialmente associado com a Dengue e o Chikungunya, em Salvador (BA), que posteriormente foi identificada como o ZIKV. O diagnóstico errôneo se dá pela similaridade dos sintomas e a prevalência desses vírus nas mesmas regiões (ZANOTTO; LEITE, 2018). Entre os anos de 2015 e 2022, foram notificados 3.732 casos de infecções congênitas, sendo 1.857 (49,8%) de Síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika (SCZ). Apesar de a Emergência em

Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN), ter sido encerrada em maio de 2017, novos casos de SCZ e óbitos associados a doença têm sido registrado em número reduzido até hoje no país (Ministério da Saúde, 2023).

1.2 Transmissão e manifestação

O ZIKV é transmitido pela picada do mosquito do gênero *Aedes*, com dois ciclos distintos de transmissão: o ciclo silvestre, envolvido na manutenção do vírus entre primatas não-humanos e mosquitos em florestas e o ciclo urbano, envolvido na transmissão entre humanos e mosquitos predominantemente por duas espécies: o *Ae. aegypti*, considerado o vetor primário associado aos surtos, e o *Ae. albopictus*. Além disso, pode ocorrer a transmissão vertical, do vírus da mãe para o feto, como alguns estudos mostraram a detecção do RNA viral na placenta, cérebro e soro de recém-nascidos com microcefalia ou de abortos (MARTINES; BHATNAGAR; KEATING; SILVA-FLANNERY *et al.*, 2016). Outros modos de transmissão incluem o sexual, por transfusão de sangue e acidentes laboratoriais (Fig. 1) (SONG; YUN; WOOLLEY; LEE, 2017).



(Adaptado de MWALIKO; NYARUABA; ZHAO; ATONI *et al.*, 2021)

Figura 1. Representação esquemática dos modos de transmissão do ZIKV e sintomas associados.

A maioria dos infectados são assintomáticos, aproximadamente 80%, ou possuem a forma leve da doença. Dentre 20-25% desenvolvem erupção cutânea, cefaleia, dor nas articulações e conjuntivite, e alguns pacientes podem apresentar vômito, diarreia, vermelhidão nos olhos, fadiga, edema, dor abdominal, perda de apetite e podem experimentar hematospermia, presença de sangue no sêmen (PIELNAA; AL-SAADAWA; SARO; DAMA *et al.*, 2020). Dentre os casos sintomáticos, 20%, resultam em infecções associadas ao ZIKV, como a síndrome de Guillain-Barré em adultos, doença imunomediada dos nervos periféricos e raízes nervosas geralmente desencadeada por infecções (LEONHARD; MANDARAKAS; GONDIM; BATEMAN *et al.*, 2019), e a microcefalia, o que fez o vírus ser incluído no grupo de infecções congênitas, denominado STORCH+Z (sífilis, toxoplasmose, outros agentes, rubéola, citomegalovírus e herpes simplex, mais Zika vírus) (RODRIGUEZ-MORALES; CULQUICHICÓN, 2017) (Secretária de Estado de Saúde, 2021)

A microcefalia congênita pode estar associada às síndromes genéticas ou injúrias como por hipóxia, distúrbios metabólicos, exposição a agrotóxicos e infecções. Esta interferência no desenvolvimento cerebral é caracterizada pelo menor perímetro cefálico o que pode causar comprometimento do sistema nervoso central (SNC) e alterações cognitivas (ALBUQUERQUE; SOUZA; ARAÚJO; BRAGA *et al.*, 2018). A SCZ inclui microcefalia grave com crânio parcialmente colapsado, afinamento do córtex com calcificações subcorticais, achados oftalmológicos incluindo degeneração macular e retinose pigmentar, contraturas congênitas (artrogripose) e hipertonia e manifestações de envolvimento extrapiramidal, além disso, a hidrocefalia e paralisia diafragmática foram acrescentadas. Essas características ajudam a distinguir de outras infecções congênitas (RASMUSSEN; JAMIESON, 2020).

1.3 Patogênese e resposta imune

O vírus exibe um amplo tropismo e pode infectar diversos tipos celulares em diferentes órgãos, especialmente aqueles considerados imunoprivilegiados, como a placenta, testículo, olho e cérebro, e tem como alvo especialmente macrófagos e seus subtipos (RODRIGUES DE SOUSA; AZEVEDO; QUARESMA; VASCONCELOS, 2021). Na pele, as células dendríticas imaturas (células de Langerhans), os

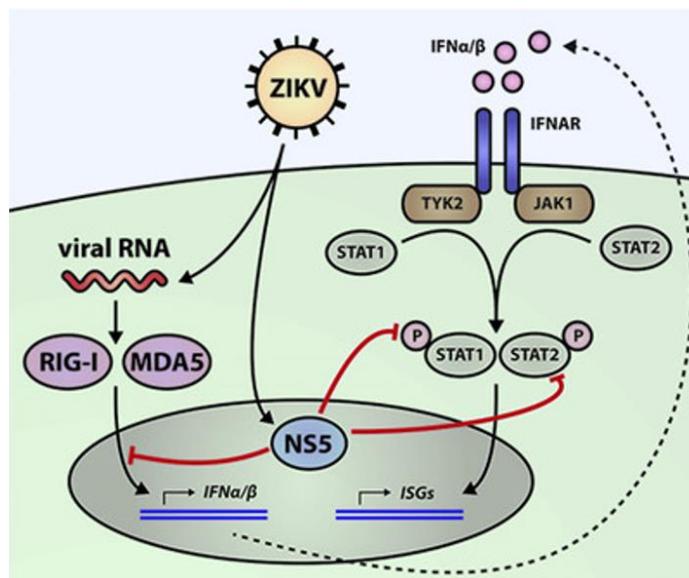
fibroblastos e queratinócitos facilitam a disseminação do ZIKV, pelos receptores DC-SIGN (*Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*) e receptores de fosfatidilserina, como Tyro 3, AXL, TIM e TAM (HAMEL; DEJARNAC; WICHIT; EKCHARIYAWAT *et al.*, 2015). Além disso, a inflamação induzida pela picada do mosquito recruta fagócitos, como monócitos, que podem carrear o vírus, favorecendo sua disseminação pelo organismo (PINGEN; BRYDEN; PONDEVILLE; SCHNETTLER *et al.*, 2016). Já na placenta, o ZIKV infecta as células de Hofbauer, trofoblastos e células endoteliais (MINER; DIAMOND, 2017). Após a passagem pela barreira placentária, estudos sugerem que o vírus tem como alvo principal as células progenitoras neurais (NPCs), o que leva a interrupção do ciclo celular e da diferenciação celular e induz a apoptose (PLOCIENNIKOWSKA; FRANKISH; MORAES; DEL PRETE *et al.*, 2021).

O reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e ao dano (DAMPs), por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) é crucial na sinalização antiviral. Os receptores do tipo RIG (RLRs), RIG-I (gene induzido por ácido retinóico I), MDA5 (proteína associada a diferenciação de melanoma 5) e LGP2, e os receptores *Toll-like* (TLRs), TLR3, TLR7 e TLR8, podem reconhecer o RNA do ZIKV. Esse reconhecimento viral induz aumento na expressão de mRNA dos genes que codificam o receptor TLR3, RIG-I e MDA5 (HAMEL; DEJARNAC; WICHIT; EKCHARIYAWAT *et al.*, 2015). A detecção de componentes virais por esses receptores pode levar a ativação dos fatores transcricionais NF- κ B, que leva a produção de citocinas pró-inflamatórias, e IRF que induz uma resposta antiviral caracterizada pela produção de interferons (IFNs) e a expressão de genes estimulados por IFN (ISGs) (PLOCIENNIKOWSKA; FRANKISH; MORAES; DEL PRETE *et al.*, 2021).

Já foi verificado que a citocina IFN- λ (IFN tipo III), que auxilia na proteção viral na interface materno-fetal (JAGGER; MINER; CAO; ARORA *et al.*, 2017) é essencial para a resistência da infecção pelo ZIKV. Além disso, camundongos adultos são naturalmente resistentes à infecção por ZIKV, mas os deficientes de receptores para IFN tipo I são suscetíveis a SCZ (CUGOLA; FERNANDES; RUSSO; FREITAS *et al.*, 2016), evidenciando a importância da produção de IFN na indução da atividade antiviral ao ZIKV. Foi demonstrado também, em linhagem celular humana, que a sinalização via RIG-I protegia as células de morte celular induzida pelo ZIKV

(SCHILLING; BRIDGEMAN; GRAY; HERTZOG *et al.*, 2020), sendo assim, essa via parece ser essencial, não somente para resposta antiviral, como também para promover a diminuição do dano tecidual causado pela infecção.

O ZIKV é um vírus envelopado de fita simples de RNA, seu genoma traduz um único e longo polipeptídeo que forma 3 proteínas estruturais (C, E, prM/M), essenciais para replicação do genoma e reconhecimento pelo sistema imune, e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), envolvidas na evasão do sistema imune (BHARDWAJ; PANDEY; RASTOGI; SINGH, 2021) (MWALIKO; NYARUABA; ZHAO; ATONI *et al.*, 2021). A NS5 é a maior e mais conservada das proteínas dos flavivírus e é antagonista de IFN que degrada STAT2 (GRANT; PONIA; TRIPATHI; BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2016), também foi visto que NS5 consegue bloquear a fosforilação de STAT1, interferindo na via de sinalização do IFN do tipo I e levando ao aumento da replicação viral (HERTZOG; DIAS JUNIOR; RIGBY; DONALD *et al.*, 2018). Também foi visto que NS5 (LI; WANG; WANG; CHEN *et al.*, 2020) pode interferir na sinalização dos RLRs, como RIG-I e MDA5, diminuindo a produção do IFN do tipo I, e, conseqüentemente a resposta antiviral (Fig. 2), assim como NS3 foi visto interferir na sinalização de RIG-I (RIEDL; ACHARYA; LEE; LIU *et al.*, 2019).

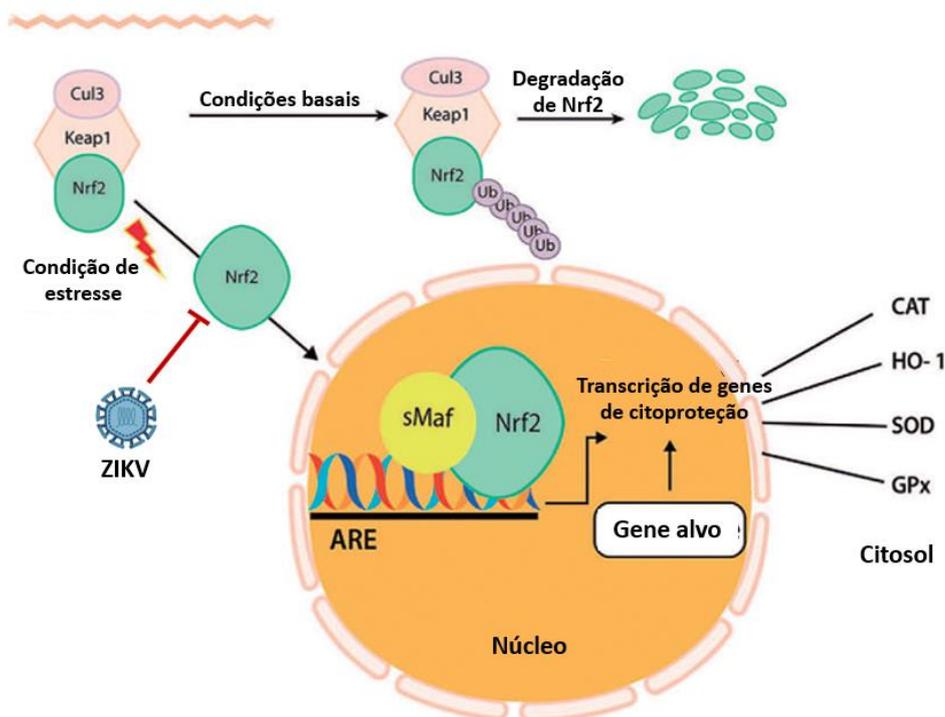


(HERTZOG; DIAS JUNIOR; RIGBY; DONALD *et al.*, 2018)

Figura 2. Interferência da proteína viral NS5 na via de sinalização do ZIKV. O reconhecimento do RNA viral pelos PRRs, como RIG-I e MDA5, leva a ativação da proteína adaptadora MAVS, que leva a uma cascata de sinalização para ativar os fatores de transcrição, incluindo IRF2 e NF-κB, que leva a transcrição de genes codificadores de IFNs do tipo I (IFN-α/IFN-β) e de outros genes antivirais. Uma vez secretado, o IFN do tipo I pode se ligar ao receptor de IFN do tipo I (IFNAR), de forma autócrina ou parácrina. Isso resulta na

ativação das quinases JAK1 e TYK2, que fosforilam e assim ativam STAT1 e STAT2. Esses fatores de transcrição formam um complexo com IRF9 e induzem a expressão de ISGs. A proteína viral NS5 pode interferir nesta via, ao interagir com os receptores do tipo RIG ou STAT1 e STAT2.

Infecções virais geralmente estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), como já foi visto com o vírus da dengue em que a gravidade da doença é determinada pelo estresse oxidativo. Em questão ao ZIKV, foi observado que a infecção leva ao aumento de EROS e a regulação negativa da via do fator nuclear eritroide 2 (Nrf2), o que favorece a injúria celular e leva a piora do quadro (ALMEIDA; FERRAZ; DA SILVA CAETANO; DA SILVA MENEGATTO *et al.*, 2020). A via do Nrf-2 tem como papel a expressão de genes antioxidantes mediado pelo elemento de resposta antioxidante (ARE) presente na região promotora do gene, e leva a expressão de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), heme oxigenase-1 (HO-1) e a glutatona peroxidase (GPx) (Fig. 3) (TORRES; LUCHINI; FERREIRA, 2022).



(Adaptado de TORRES; LUCHINI; FERREIRA, 2022)

Figura 3. Representação da via de sinalização Nrf2-Keap1-ARE. Em condições normais a Nrf2 é regulada negativamente pela proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch (Keap 1), que promove a degradação do Nrf2 pela via da ubiquitina-proteassoma. Enquanto em situações de estresse oxidativo, haverá a dissociação do complexo Keap 1-Nrf2 permitindo assim que

o Nrf2 se desloque para o núcleo, onde recruta a proteína maf pequena (sMaf) formando um heterodímero que se liga aos AREs, localizados na região promotora do gene alvo e assim dando início a transcrição de genes de citoproteção. Essa via pode levar a expressão de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a heme oxigenase-1 (HO-1). O ZIKV possui a capacidade de regular negativamente a via de Nrf2, favorecendo a injúria celular pelas EROS.

Levando em consideração que o ZIKV, além de neurotrópico (MINER; DIAMOND, 2017; VAN DEN POL; MAO; YANG; ORNAGHI *et al.*, 2017), possui tropismo por outros tecidos como para órgãos reprodutores, tecido ocular, hepatócitos, células epiteliais, fibroblastos, células renais, células mononucleares do sangue periférico, neutrófilos, além do tecido placentário (NGONO; SHRESTA, 2018), controlar o dano tecidual é imprescindível.

Os flavonoides são conhecidos por terem atividade antiviral contra o HIV-1, herpes simplex 1 e 2, influenza, dengue e febre amarela, pela interação entre os anéis de fenol dos flavonoides e as proteínas virais e/ou RNA, ou pela sua capacidade de interferir na defesa da célula hospedeira pela regulação da sinalização de MAP quinase (MAPK) (CATANEO; KUCZERA; KOISHI; ZANLUCA *et al.*, 2019). Além disso, possuem importantes efeitos protetivos, incluindo anti-inflamatório, antioxidante e contra o câncer. O interesse na atividade antiviral dos flavonoides aumentou com a última década pela frequência de infecções virais, e pelo fato de drogas antivirais geralmente possuírem eficácia limitada e efeitos adversos graves, sendo uma alternativa para tratar doenças virais com nenhum ou leves efeitos adversos (NINFALI; ANTONELLI; MAGNANI; SCARPA, 2020).

A naringenina (NAR) é um flavonoide predominantemente extraído de frutas cítricas e possui diversas ações no organismo, incluindo a anti-inflamatória e analgésica. Foi vista a atividade antiviral da NAR em células dendríticas derivadas de monócitos infectadas pelo ZIKV, sugerindo que a molécula age na replicação viral ou na formação das partículas virais. Além disso, por análise molecular foi sugerido uma interação entre a NAR e o domínio de protease da proteína NS2B-NS3 do ZIKV (CATANEO; KUCZERA; KOISHI; ZANLUCA *et al.*, 2019).

Sendo assim, esse projeto tem como objetivo estudar o efeito antiviral, antioxidante e anti-inflamatório do uso de agonistas de RIG-I, agonistas de receptores do tipo *Toll* e da naringenina, na infecção de linhagens celulares por ZIKV. E com isso,

elucidar com esse estudo as vias em que cada composto atua visando atenuar a infecção e a morte celular induzida pelo vírus.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliar o efeito da antiviral, antioxidante e anti-inflamatório do uso de agonistas de RIG-I e TLR3 e da naringenina, na infecção de linhagens celulares por ZIKV.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade da linhagem celular de monócitos (THP-1), quanto ao estímulo de agonistas de RIG-I, TLR3 ou da naringenina.
- Avaliar o efeito do tratamento, em THP-1, com os agonistas de RIG-I, TLR3 ou da naringenina, quanto à expressão de fatores antivirais MxA, IFN- β , IRF3, IRF7, STING, RIG-I e MDA5.
- Avaliar o efeito antioxidante da NAR em THP-1, quanto à expressão de fatores antioxidantes SOD2, catalase e GXP-1.
- Avaliar o efeito do tratamento com agonistas de TLR3, RIG-I ou NAR em THP-1, quanto à produção de citocinas e quimiocinas
- Avaliar a diferença na expressão de fatores antivirais (MxA, IFN- β , IRF3, IRF7, STING, RIG-I e MDA5) entre a linhagem celular de monócitos (THP-1) e macrófagos derivados da linhagem THP-1, frente ao tratamento com agonista de TLR3 ou com NAR.
- Avaliar a diferença na expressão de fatores antioxidantes (SOD2, catalase e GXP-1) entre THP-1 e macrófagos derivados da linhagem THP-1, frente ao tratamento com NAR.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com agonista de TLR3 ou NAR e infecção com Zika vírus em THP-1, quanto à viabilidade celular e produção de citocinas e quimiocinas

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagem celular humana

Como linhagem-modelo dos monócitos, empregaremos as células THP-1, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 2mM de L-glutamina, 10mM de HEPES, 100U/mL de penicilina (PS), 100ug/mL de estreptomicina e 10% de Soro fetal bovino (SFB) inativado e mantidas em atmosfera de 5% CO₂ e 37°C. A utilização dessa linhagem nos permitirá avaliar como a infecção por ZIKV se comportará mediante ao uso de agonistas da resposta antiviral e do agente antioxidante em uma célula imune que participa ativamente da resposta antiviral e pode estar envolvida no transporte desse vírus para a placenta.

3.2 Tratamento das linhagens celulares THP-1

Foram utilizados o agonista de RIG-I (InvivoGen), agonista de TLR3 Poly I:C (InvivoGen) e naringenina (Sigma-Aldrich).

As células THP-1 foram cultivadas em uma placa de 48 poços, com $0,5 \cdot 10^6$ células por poço em um volume de 500µl de meio de cultura e tratadas com 0,5µg/ml e 1µg/ml do agonista de RIG-I (5´ppp-dsRNA) (InvivoGen), com 0,5µg/ml e 1µg/ml do controle negativo para RIG-1 (5´ppp-dsRNA Control), com 1µg/ml, 2µg/ml do agonista de TLR3 (Poly I:C) ou com 50µM/ml e 80µM/ml da NAR. Para o tratamento das células, fizemos a transfecção do agonista de RIG-I com o agente de transfecção LyoVec (InvivoGen). Já o tratamento com Poly I:C foi realizado com e sem o agente de transfecção para avaliar seu efeito na viabilidade celular e na ativação das células.

3.3 Diferenciação da linhagem THP-1 em macrófago e tratamento

As células THP-1 foram cultivadas em uma placa de 6 poços, com $1 \cdot 10^6$ células por poço em um volume de 2ml e incubadas com 50ng/ml de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma), lavadas depois de 24h com RPMI-1640 e mantidas mais

24h em meio novo. Após esse processo, foi realizado o tratamento com 1µg/ml, 2µg/ml do agonista de TLR3 (Poly I:C) transfectado, com 50µM/ml ou 80µM/ml da NAR.

3.4 Infecção *in vitro* e tratamento

O vírus utilizado foi da cepa asiática de ZIKV isolado Pernambuco 243 (PE/243). As células THP-1 foram cultivadas em uma placa de 48 poços, com $0,5 \cdot 10^6$ células por poço em um volume de 500µl de meio e expostas a diferentes multiplicidades de infecção (MOIs) por 2 horas na estufa (37°C e 5% CO₂). Após a incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas 2 vezes com RPMI-1640 e cultivadas novamente com o meio suplementado.

Para os ensaios com tratamento, as células foram tratadas com 2µg/ml do agonista de TLR3 (Poly I:C), com agente de transfecção LyoVec, ou com 80µM/ml da NAR por 12 horas, e, depois infectadas com ZIKV.

3.5 Avaliação da morte celular, por citometria de fluxo

Após serem tratadas com a maior dose de agonista de RIG-I (1µg/ml), de 5'ppp-dsRNA Control (1µg/ml), de Poly I:C (2µg/ml) ou da NAR (80µM/ml) por 24 horas e 48 horas, as células foram coletadas para avaliar por citometria de fluxo a viabilidade. Utilizamos para marcação 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) e/ou LIVE/DEAD, para detecção das células mortas.

Para a análise do efeito citopático do ZIKV, células THP-1 pré-tratadas com Poly I:C (2µg/ml) ou NAR (80µM/ml) por 12 horas, foram infectadas e coletadas, em diferentes tempos pós-infecção (15 min, 24h, 48h, 72h, 96h e 7 dias) para avaliar por citometria de fluxo a viabilidade celular. Utilizamos marcação com LIVE/DEAD para detecção das células mortas.

3.6 Avaliação de mRNA por RT-qPCR após tratamento

Para dosar os transcritos dos genes dos fatores antivirais e antioxidantes da THP-1 tratada com as duas doses dos agonistas de RIG-I, TLR3 ou da naringenina, dosamos o mRNA produzido pelas células com o RT-qPCR. A extração do RNA foi feita pelo Kit QIAGEN RNeasy, utilizando as instruções do fabricante. As concentrações de RNA foram mensuradas com auxílio do espectrofotômetro nanodrop (Thermo Scientific). Para obtenção de cDNA a partir do RNA total purificado foi utilizado o kit iScript™ (Biorad, Hercules, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de amplificação foi feita utilizando para cada amostra 5 µL de cDNA a 5 ng/µL, 7 µL da solução SYBR® Green (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) e 2 µL (1 µM ou 5 µM) dos *primers* sense e anti-sense para os genes alvos e controle interno GAPDH, todos sintetizados pela Invitrogen. A amplificação foi realizada no aparelho 7500 (AppliedBiosystem). A análise e os resultados da amplificação foram realizados com o auxílio do programa 7500 Software v2.0.6 (AppliedBiosystems) utilizando a fórmula $2^{-\Delta CT}$ para o cálculo da expressão normalizada no mRNA. Os primers empregados na reação estão listados na tabela 1:

Tabela 1. Primers usados na dosagem dos transcritos dos genes de fatores antivirais e antioxidantes

	Forward	Reverse
Catalase	5'- CTCCGGAACAACAGCCTTCT-3'	5'- GAATGCCCGCACCTGAGTAA-3'
GXP-1	5'-TTGAGAAGTTCCTGGTGGGC-3'	5'-CGATGTCAGGCTCGATGTCA-3'
IFN-β	5'- CATTACCTGAAGGCCAAGGA -3'	5'- CCATTGTCCAGTCCCAGAGG -3'
IRF3	5'- AGAGGCTCGTGATGGTCAAGGTT -3'	5'- AGAGTGGGTGGCTGTTGGAAATG -3'
IRF7	5'- TGGTCCTGGTGAAGCTGGAA -3'	5'- GATGTCGTCATAGAGGCTGTTG -3'
MDA5	5'- GCCATTGCAGATGCAACCAG -3'	5'- TTGCGATTTCTTCTTTTGCAG -3'
MxA	5'-AAGCTGATCCGCCTCCACTT-3'	5'-TGCAATGCACCCCTGTATACC-3'
RIG-I	5'- CTGGACCCTACCTACATCCTG-3'	5'- GGCATCCAAAAGCCACGG-3'
SOD2	5'- GCCCTGGAACCTCACATCAA-3'	5'- TCAGGTTGTTTACGTAGGCC-3'
STING	5'- ATATCTGCGGCTGATCCTGC -3'	5'- GGTCTGCTGGGGCAGTTTAT -3'
GAPDH	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'	5'- GAAGATGGTGATGGGATTTTC -3'

3.7 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo

A determinação de quimiocinas e citocinas foi realizada por citometria de fluxo, utilizando os kits IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, CXCL-10, CCL2, CCL3, IL-8 *Single Flex Set* (BD) e o *Human Chemokine Kit* (BD) para CXCL8, CCL5, CXCL9, CCL2 e CXCL10 de acordo com as instruções do fabricante. Os limites mínimos de detecção estão apresentados na tabela 2:

Tabela 2. Limite mínimo de detecção dos kits de CBA

Analito	Limite de detecção	Marca
CXCL10	2,8 pg/mL	BD Bioscience
CCL2	2,7 pg/mL	BD Bioscience
CCL5	1,0 pg/mL	BD Bioscience
CXCL8	0,2 pg/mL	BD Bioscience
CXCL9	2,5 pg/mL	BD Bioscience
IL-1 β	2,3 pg/mL	BD Bioscience
IL-6	1,6 pg/mL	BD Bioscience
TNF	1,2 pg/mL	BD Bioscience
IL-10	0,13 pg/mL	BD Bioscience

3.8 Quantificação da carga viral por RT-qPCR/Taqman

Para a quantificação da carga viral no sobrenadante foi feita a extração do RNA pelo kit de extração QIAamp Viral RNA (Qiagen) e para extração do RNA das células pelo Kit QIAGEN RNeasy, de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de amplificação foi feita utilizando para cada poço 10 μ L da amostra, 5 μ L do *TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix* (Thermo Scientific), 5 μ L Nuclease-free water e 0,82 μ L do mix de primers e sonda (100 μ M). A amplificação foi realizada no aparelho 7500 (AppliedBiosystem). Os primers e sonda utilizados na reação estão listados na tabela 3:

Tabela 3. Primers e sonda usados na quantificação viral

	ZIKV
Primer Foward	5´- CCGCTGCCCAACACAAG - 3´
Primer Reverse	5´- CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT- 3´
Sonda	FAM- AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-MGB

A quantidade de cópias virais nas amostras foi estimada com base em uma curva-padrão prepara com diluições conhecidas dos inóculos.

3.9 Análise estatística

As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando os testes estatísticos não paramétricos Wilcoxon (dados pareados para análise de 2 grupos) e *Fridman* (dados pareados com mais de dois grupos). O nível de significância será considerado quando $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da cultura e expansão da linhagem celular THP-1

Inicialmente avaliamos o padrão de crescimento da THP-1 e qual a melhor técnica para cultivo. O descongelamento é um processo agressivo para as células, já que envolve bruscas mudanças de temperatura desde o nitrogênio líquido (-196°C) até atingir temperatura ideal (37°C). Além disso, o meio de congelamento é tóxico devido ao DMSO. Observamos que para atingir um ritmo de crescimento normal, leva-se de 7 a 10 dias e a partir daí foi visto que a população celular chega a dobrar em cerca de 72 horas após seu repique (Fig. 4A), ou seja, a adição de meio novo. Observamos também um período inicial de queda na viabilidade celular, que leva de 5 a 7 dias para recuperar e ultrapassar 80% de células viáveis (Fig. 4B).

O crescimento das células em cultura foi acompanhado pela câmara de *Neubauer* e a viabilidade celular pela adição do azul de Trypan que permite identificar as células não viáveis que ficam coradas em azul (Fig. 4D). Além disso, utilizamos o microscópio invertido, diariamente, para avaliar a morfologia e distribuição das células pela garrafa (Fig. 4C).

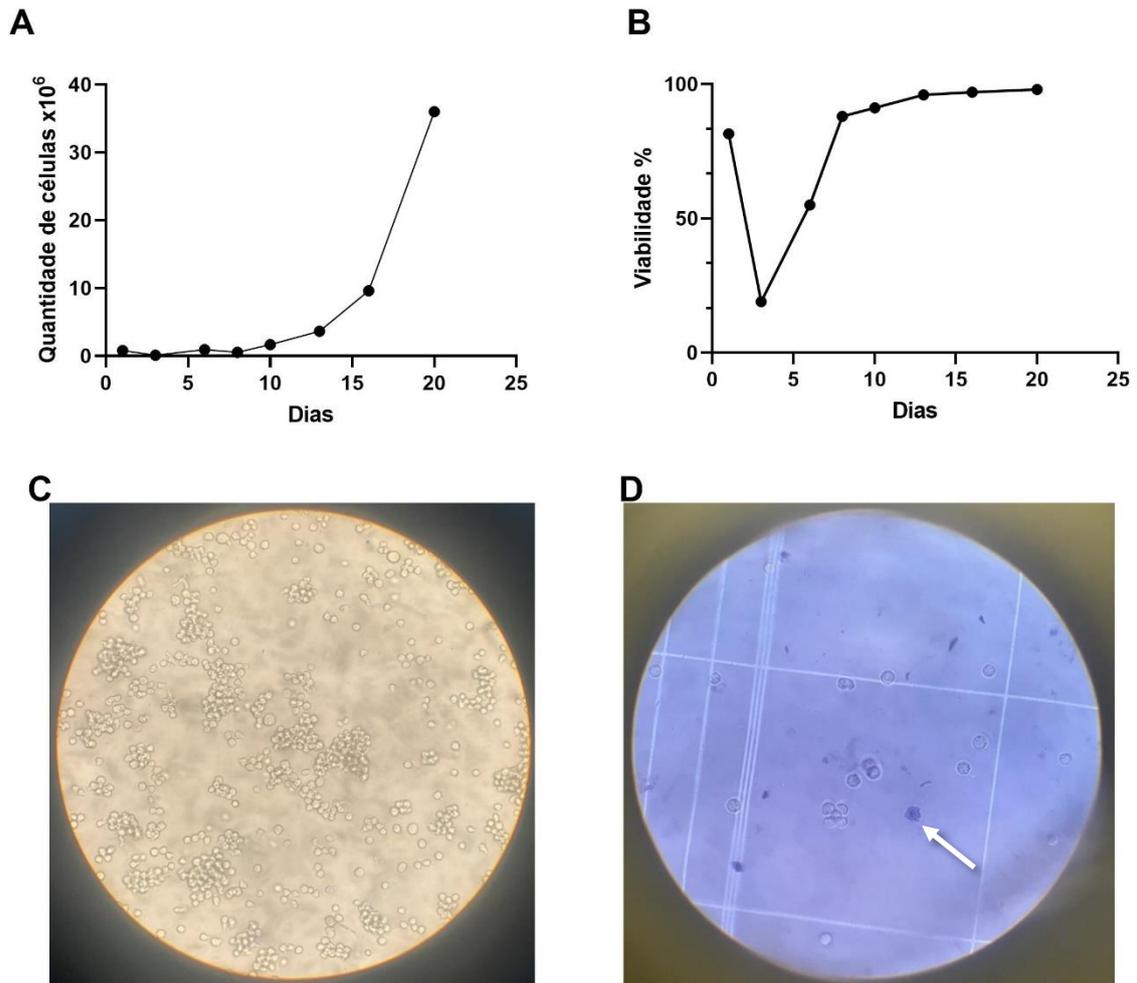


Figura 4. Cultivo da linhagem celular THP-1. (A) As células descongeladas foram cultivadas em meio RPMI com SFB e PS, seu crescimento foi monitorado pela câmara de *Neubauer* e a quantidade total de células foi obtido a partir de sua concentração e volume total do meio de cultivo. (B) A viabilidade foi calculada adicionando o azul de Trypan e a (D) contagem foi realizada no microscópio em um aumento de 40X, as células azuis indicam que estão em apoptose (seta branca). (C) Pelo microscópio invertido foi possível avaliar a morfologia das células e a formação de arranjos.

4.2 Análise de viabilidade celular após estímulo

Já que utilizaríamos diferentes estímulos antivirais e antioxidantes, avaliamos se os estímulos poderiam ser deletérios para as células em cultura após 24 e 48 horas.

Para tanto, utilizamos as maiores doses do agonista de RIG-I e seu controle negativo com o agente de transfecção, do agonista de TLR3 com e sem o agente de transfecção e a naringenina. Após o tempo de incubação, realizamos a marcação com 7-AAD e LIVE/DEAD, para determinar a viabilidade celular, comparado à amostra basal (não estimulada).

Como estratégia de análise por citometria de fluxo, primeiro delimitamos o *gate* de *singlet* e depois um *gate* que separasse as *single cells*, para selecionar aquelas células que passaram pelo canal do citômetro individualmente. Por fim, ao obter a população de células desenhamos o *gate* negativo para marcação de 7-AAD e LIVE/DEAD, portanto, a população viável (Fig. 5).

Foi visto que em 24 horas, tanto os agonistas quanto a naringenina, não trouxeram uma diminuição significativa da viabilidade celular (Fig. 6A). Resultados semelhantes foram obtidos nas culturas de 48hs (Fig. 6B). Nesse contexto, vale ressaltar que, apesar de ser possível observar que na presença do agente de transfecção (LyoVec) com Poly I:C a viabilidade celular diminuiu para cerca de 85%, conforme mostrado nos gráficos e histogramas, essa diminuição não foi estatisticamente significativa, mas pode sugerir que este agente possui esse efeito provavelmente por ativar mais a célula.

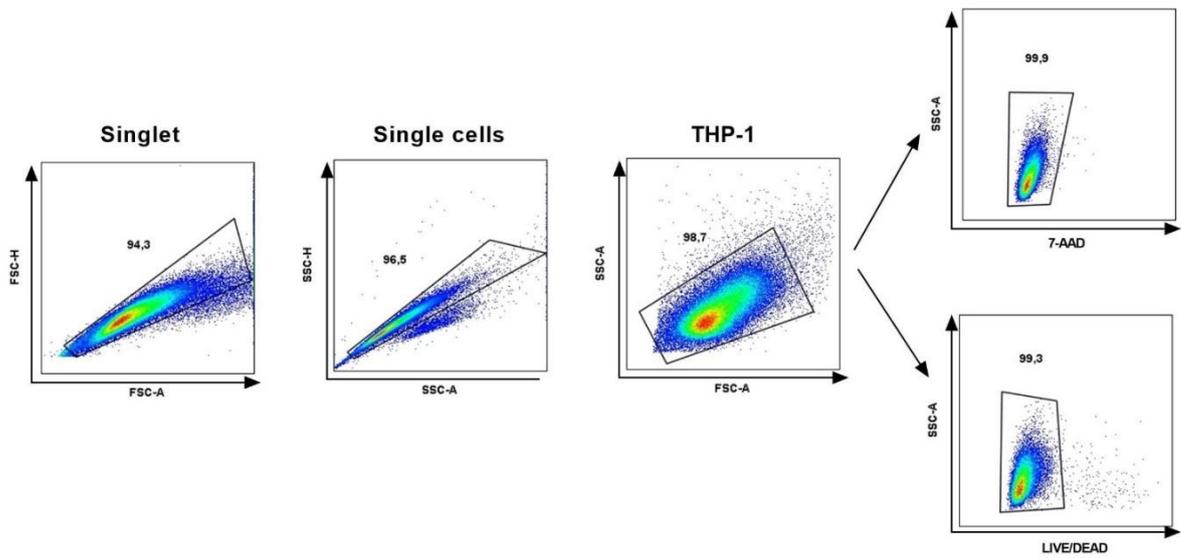
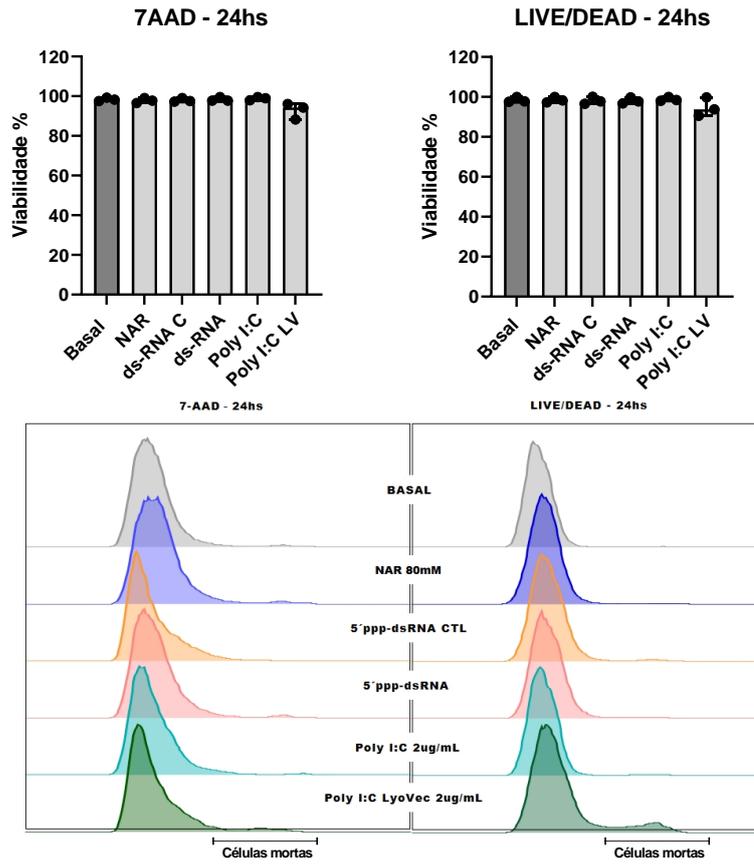


Figura 5. Estratégia de análise para a citometria de fluxo. A estratégia para analisar a viabilidade das células THP-1 foi por meio de *gates* para *singlet*, *single cells* e pela marcação 7AAD (PercP-Cy5) e LIVE/DEAD (Texas-red).

A.



B.

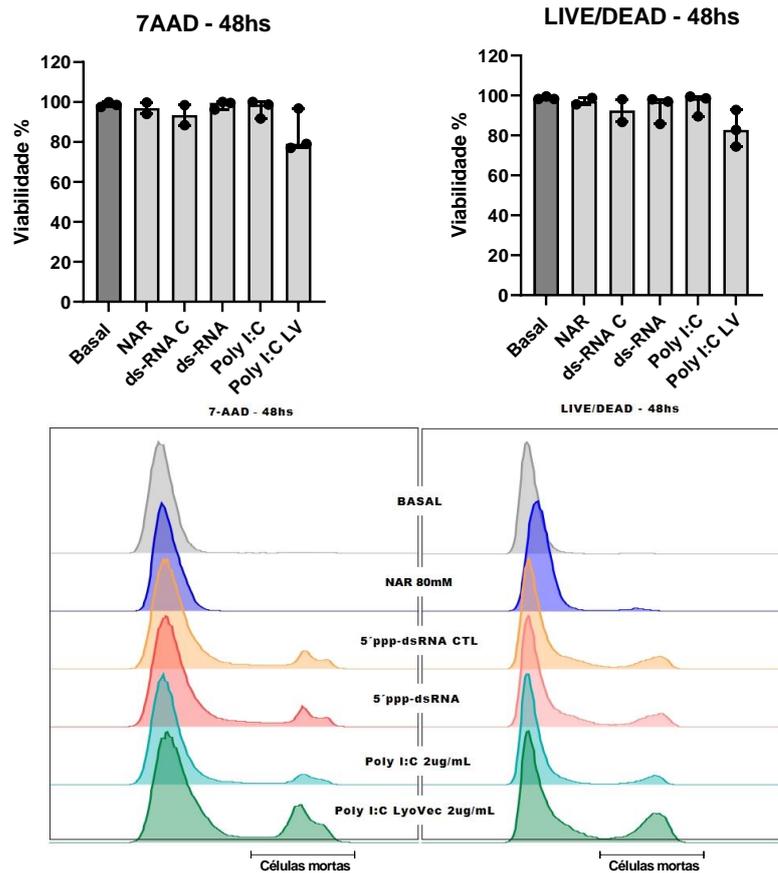


Figura 6. O estímulo dos agonistas de RIG-I, TLR3 e da naringenina não gerou queda significativa na viabilidade celular. A viabilidade celular foi analisada por citometria de fluxo das células coletadas após (A) 24 horas e (B) 48 horas de estímulo (n=3), em gráficos para marcação de 7AAD (PercP-Cy5) e LIVE/DEAD (Texas-red). A análise da morte celular também é demonstrada por histogramas para as duas marcações e tempos. 5´ppp-dsRNA controle negativo (ds-RNA C), 5´ppp ds-RNA (ds-RNA), Poly I:C LyoVec (Poly I:C LV). Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil.

4.3 Análise de fatores antivirais e antioxidantes por RT-qPCR

Para analisar os fatores antivirais (MxA, IFN-beta, IRF3, IRF7, STING, RIG-I e MDA5) e antioxidantes (SOD2, GXP-1 e catalase), foi feito o RT-qPCR de células THP-1 estimuladas com duas doses diferentes de cada estímulo, após 12 e 24 horas de cultura. Foi possível observar que a transfecção de Poly I:C levou ao aumento da maioria dos fatores antivirais para 12 horas, com exceção do STING que também não aumentou para os outros estímulos (Fig. 7A). Já em 24 horas, o Poly I:C com o agente de transfecção provavelmente teve seus efeitos diminuídos, alterando menos a expressão dos fatores antivirais em comparação com o basal, indicando que esse período já é tardio para a análise da expressão gênica de mRNA (Fig. 7B). Além disso, podemos observar que o agonista de RIG-I (5´ppp ds-RNA) não apresentou diferença na expressão desses fatores, quando comparado com seu controle negativo (5´ppp ds-RNA CLT), tanto em 12 e 24 horas, sugerindo ser um fraco estimulante das células THP-1.

Já para os fatores antioxidantes, observamos que GXP-1 foi o que mais sofreu aumento pelo uso da naringenina, principalmente pelo estímulo da maior dose nos dois tempos, enquanto, a catalase apresentou um discreto aumento em 12 e 24 horas e SOD2 apenas em 12 horas.

Figura 7. RT-qPCR de fatores antivirais e antioxidantes. O RT-qPCR foi feito após 12 horas (A) e 24 horas (B) de cultura (n=1). Quanto mais intensa a cor vermelha, maior a expressão de mRNA dos fatores antivirais e antioxidantes e quanto mais intenso o azul, menor a expressão. Os dados foram mostrados utilizando a expressão normalizada de acordo com amplificação do gene o *housekeeping* (GAPDH).

4.4 Análise de quimiocinas e citocina por CBA

Pela técnica e análise do CBA, dosamos as quimiocinas CXCL10, CCL2 e CCL3 e a citocina IL-8, 24 e 48 horas após estímulo. É possível observar que a maior dose do Poly I:C transfectado levou ao aumento de todas as quimiocinas e da citocina analisadas no tempo de 24 horas (Fig. 8A, C, E e G) e do CXCL10 e CCL2 após 48 horas de estímulo (Fig. 8B e D). Já a naringenina e o agonista de RIG-I, assim como a menor dose do Poly I:C LyoVec e o estímulo de Poly I:C sem o agente de transfecção não apresentaram atividade moduladora significativa para os analitos analisados (Fig. 8 A-G).

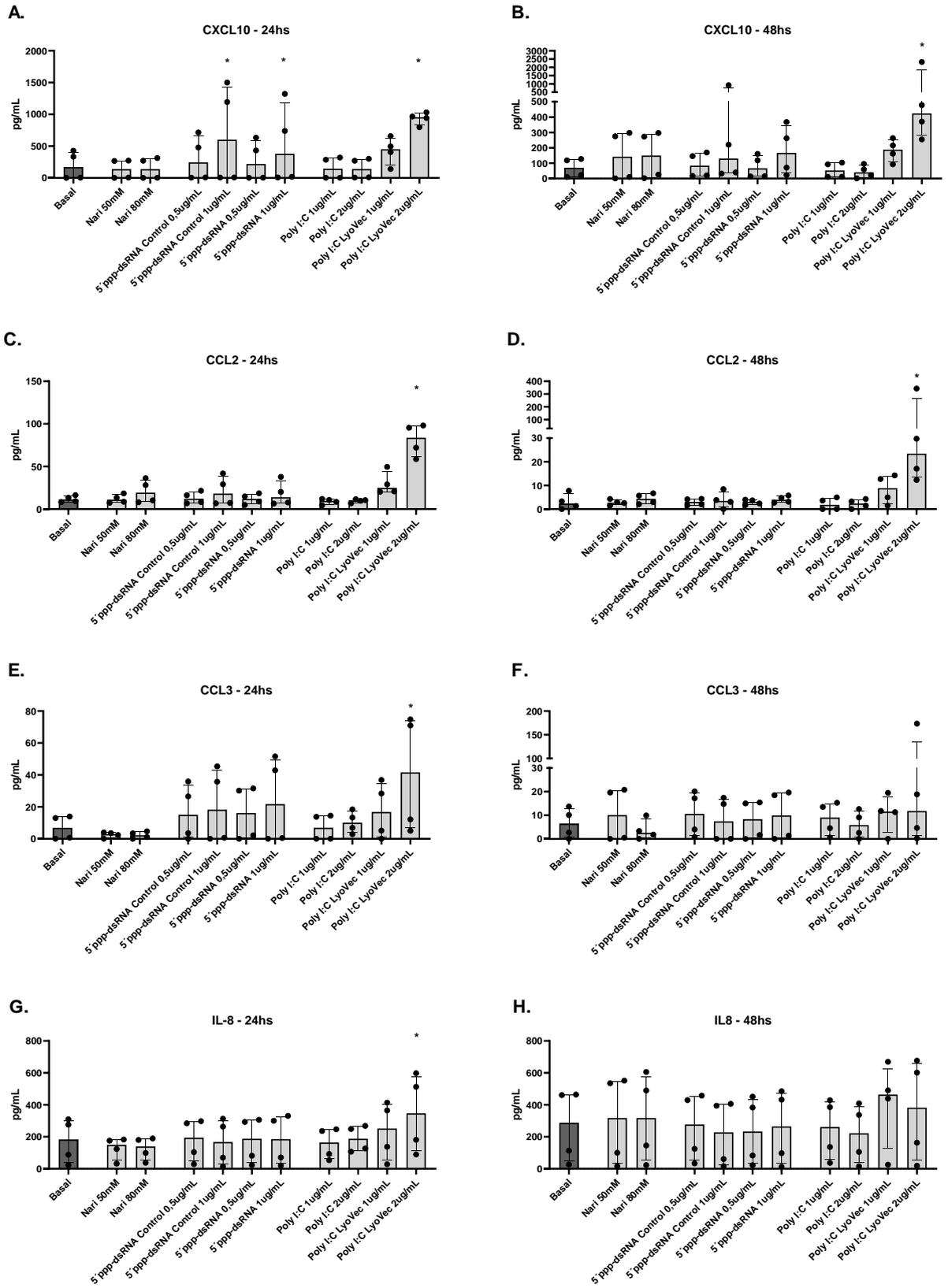


Figura 8. Efeito modulador do Poly I:C LyoVec na secreção de quimiocinas e citocina IL-8, nas células THP-1. Concentrações das quimiocinas CXCL10, CCL2, CCL3 e citocina IL-8, presentes no sobrenadante de cultura de células THP-1 estimuladas após 24 e 48 horas. Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. * $p \leq 0,05$

A partir dos resultados dos experimentos iniciais vimos que os agonistas e a naringenina não alteram significativamente a viabilidade celular, e, a transfecção do Poly I:C se mostrou promissora, pois foi verificado o aumento da expressão de fatores antivirais como o MxA e da quimiocina CXCL10, dependente de interferon. Além disso, como nos experimentos anteriores o agonista de RIG-I não levou ao aumento da expressão dos fatores antivirais ou de quimiocinas e citocinas, optamos por não o utilizar nas análises seguintes, assim como o Poly I:C sem o agente de transfecção (LyoVec).

4.5 Comparação entre linhagem celular THP-1 e macrófagos derivados de THP-1

Após os resultados obtidos no PCR e no CBA, nos questionamos se ao utilizar macrófagos, devido ao seu perfil imunológico ser mais ativado que monócitos, iríamos obter uma maior resposta das células a exposição do agonista de TLR3 e da naringenina. Usando o protocolo de diferenciação de macrófagos a partir de THP-1, pudemos analisar a expressão de fatores antivirais (MxA, IFN-beta, IRF3, IRF7, STING, RIG-1 e MDA5) e antioxidantes (SOD2, GXP-1 e catalase) frente ao tratamento dos macrófagos após 4 e 12 horas, por RT-PCR. A análise após 4 horas de estímulo foi realizada para ver se haveria aumento precoce da expressão de alguns dos fatores analisados, já que a análise anterior em THP-1 mostrou que com 24h a maioria dos fatores antivirais estavam diminuídos na célula THP-1, quando comparado com o tempo de 12h. Vale ressaltar que também expandimos o número de amostras analisadas (n=4).

Em 4 horas observamos o aumento do fator antiviral IRF3 em THP-1 estimulados com Poly I:C (Fig. 9A), enquanto para macrófagos IRF3 aparece aumentado para todas as condições, inclusive no basal (Fig. 9C). Além disso, em macrófagos houve aumento importante da expressão de MDA5 que não é visto em THP-1. Já em 12h de estímulo, a expressão gênica de mRNA entre THP-1 (Fig. 9B) e

macrófagos (Fig. 9D) parece similar, com exceção de MDA5 que está mais aumentado no macrófago estimulado com Poly I:C. Para os fatores antioxidantes, levando em conta as diferentes escalas, os macrófagos expressaram mais GXP1 em 4h (Fig. 9C) quando comparado com THP-1 (Fig. 9A). Já em 12h observamos discreto aumento na expressão de SOD2 para a NAR 50mM e o basal nos macrófagos (Fig. 9D), comparado com THP-1 (Fig. 9B).

Em questão as diferenças vistas em 4 e 12h de estímulo, podemos dizer que a maioria dos fatores antivirais aumentam após 12h de estímulo com Poly I:C, com exceção de IRF3 que parece ter a expressão mais precoce. Para os fatores antioxidantes, não foi observado grandes diferenças. Isso tanto em THP-1, quanto macrófago (Fig. 9A-D).

Dado que o efeito na expressão dos fatores antivirais foi maior com Poly I:C na concentração de 2µg/ml, e o efeito da naringenina para os fatores antioxidantes foi similar nas duas doses, decidimos utilizar as maiores concentrações de estímulos para o pré-tratamento das células a serem infectadas.

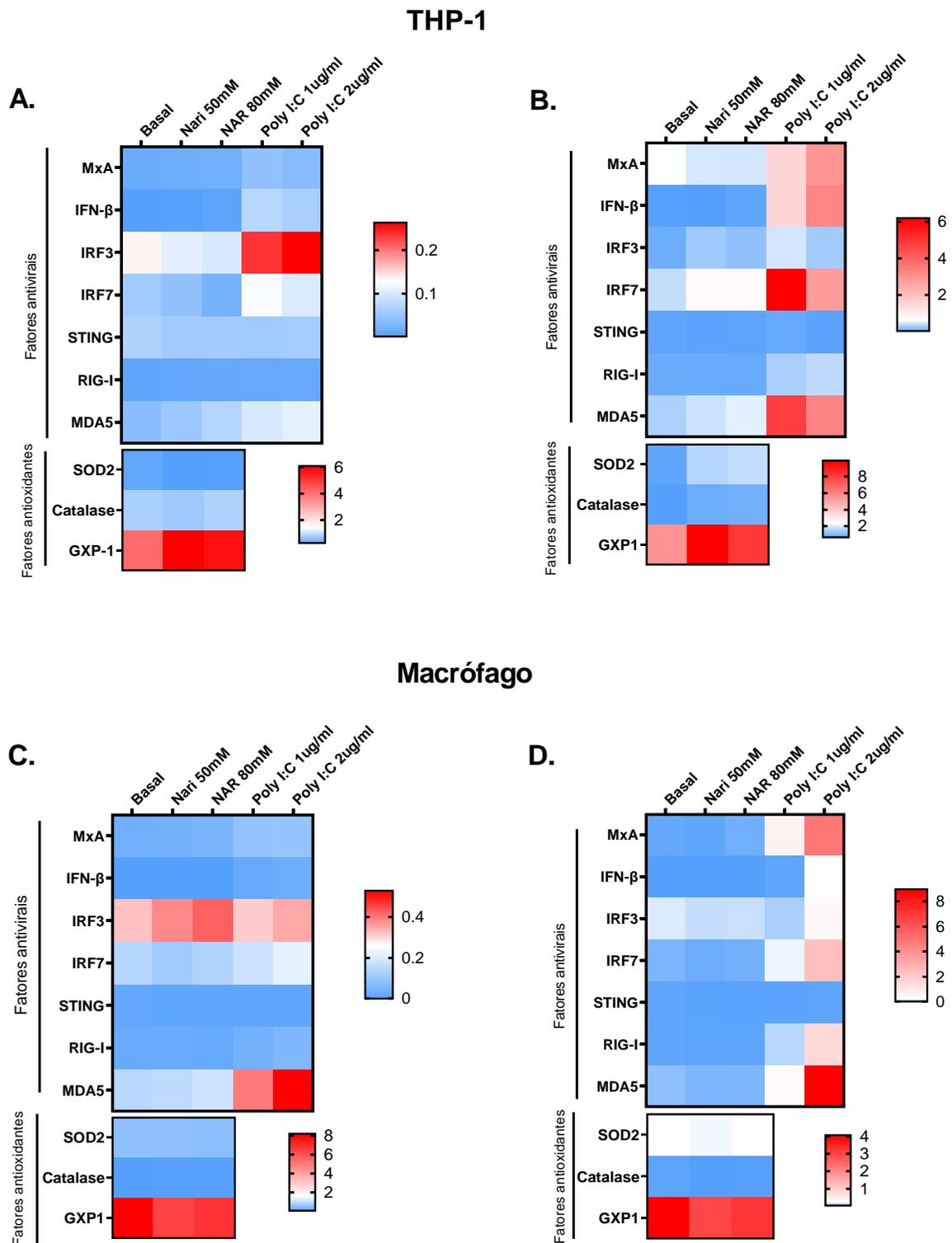


Figura 9. RT-qPCR de fatores antivirais e antioxidantes. O RT-qPCR foi feito após 4 horas (A) e 12 horas (B) de cultura da célula THP-1 (n=4) e 4 horas (C) e 12 horas (D) de cultura de macrófago (n=1). Quanto mais intensa a cor vermelha, maior a expressão de mRNA dos fatores antivirais e antioxidantes e quanto mais intenso o azul, menor a expressão. Os dados foram mostrados utilizando a expressão normalizada de acordo com amplificação do gene *housekeeping* (GAPDH).

4.6 Padronização da infecção em THP-1

Para a infecção com ZIKV as células THP-1 foram expostas por 2h a MOIs diferentes do vírus, lavadas e coletadas 15 minutos, 24, 48, 72 e 96h pós-infecção (Fig. 10A). A carga viral da célula e do sobrenadante foi quantificada por PCR. Podemos observar a carga viral presente dentro da célula (Fig. 10B) após 24h diminui, independente do MOI utilizado e que a curva do MOI 0,5 e 1 se sobrepõem. Já no sobrenadante (Fig. 10C), foi detectada maior carga viral nas culturas infectadas com maior MOI e se manteve até 96h. Para o MOI 0,5 e 1, assim como a quantificação na célula, observamos um padrão de cinética parecido, com pico em 72h seguido de uma queda em 96h.

Com intuito de observar o efeito citopático de diferentes MOIs do vírus na morfologia das células THP-1, utilizamos o microscópio invertido (Fig. 10D). Após 96h, podemos ver uma mudança na morfologia da célula, apresentando um contorno mais irregular e, apesar da secreção do vírus ter sido maior na cultura infectada com MOI 2,5 não vimos aparente efeito citopático quando comparado com os menores MOIs. Sendo assim, optamos por seguir os experimentos de infecção com o MOI 1 já que, possivelmente, obteríamos o resultado esperado, mas, utilizando menos vírus.

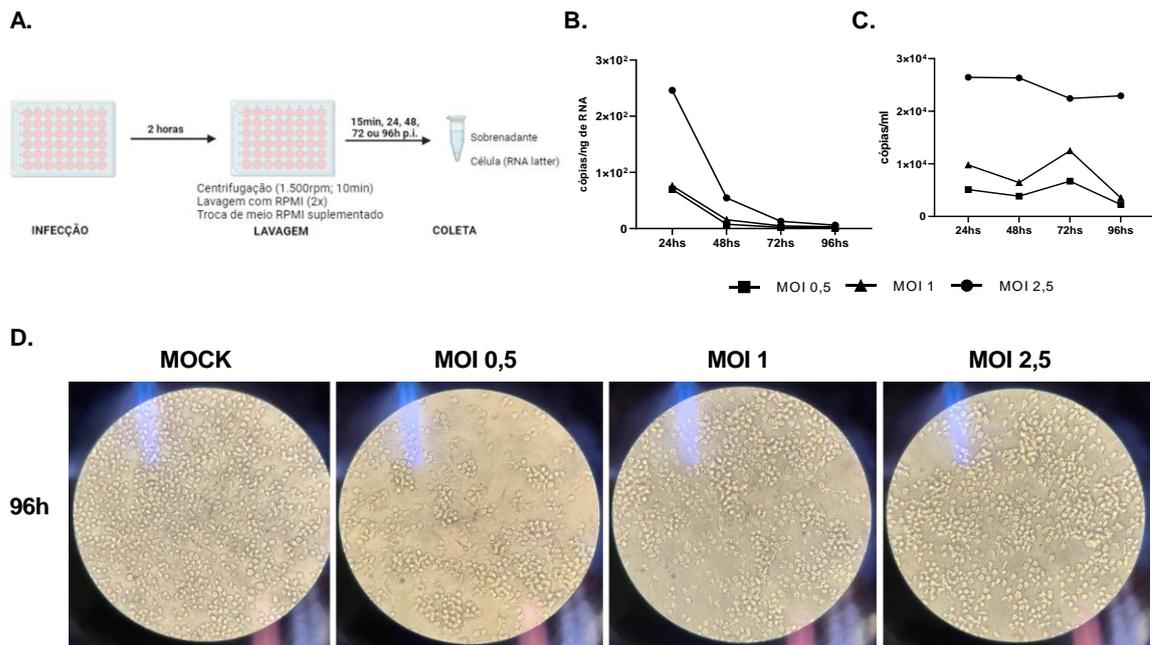


Figura 10. Padronização da infecção. Modelo esquemático da infecção da THP-1 com ZIKV e períodos de análise (A), quantificação da carga viral na célula (B) e no sobrenadante (C), e monitoramento do efeito citopático do ZIKV observados pelo microscópio invertido (D). Pós-infecção: p.i.

4.7 Efeito do pré-tratamento e infecção com ZIKV na viabilidade celular das células THP-1

As células THP-1 foram tratadas por 12h com agonista de TLR3, LyoVec como controle negativo ou NAR e depois infectadas com ZIKV MOI 1. Para avaliar o efeito dessas condições na viabilidade celular, as culturas foram avaliadas 15 min, 24, 48, 72, 96h ou 7 dias pós-infecção. Para isso foi feita marcação com LIVE/DEAD.

Analisando os gráficos de células vivas, observamos que 15 min p.i. é o único tempo em que não é visto efeito citopático do pré-tratamento e infecção (Fig. 11A). Após 24h há diminuição na viabilidade da cultura pré-tratada com Poly I:C transfectado (Fig. 11B), sendo que nos experimentos anteriores vimos que o Poly I:C tinha seu efeito citopático após 48h de tratamento. A partir de 48h, podemos observar que o meio com LyoVec tem o número de células vivas diminuído, em comparação com o meio apenas infectado (Fig. 11C) e em 72h chega próximo a porcentagem da cultura com Poly I:C (Fig. 11D).

O efeito citopático do vírus é observado 96h p.i., em que a viabilidade cai para 80%, assim como a cultura tratada com NAR (Fig. 11E). Além disso, o poço tratado com agonista de TLR3 tem uma queda de cerca de 50% na viabilidade celular. Após 7 dias o vírus teve capacidade de matar todas as células já que o Mock, não infectado e/ou tratado, foi o único que se manteve viável (Fig. 11F).

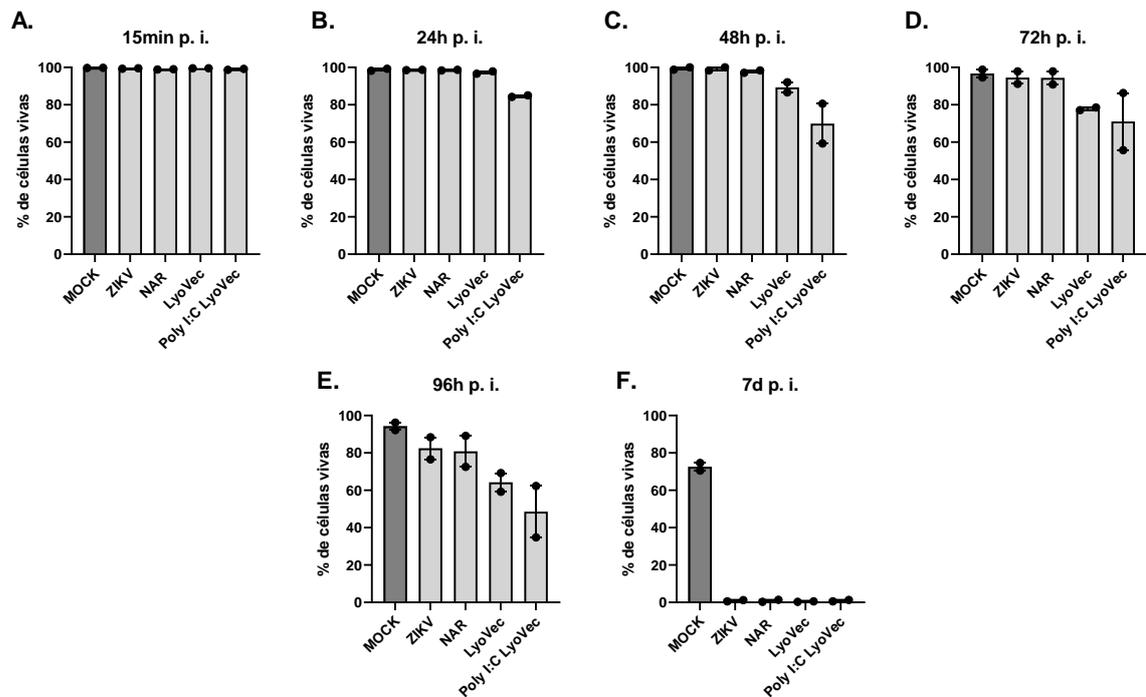


Figura 11. Análise da viabilidade celular após o pré-tratamento e infecção por ZIKV. A viabilidade celular foi vista pela análise com citometria de fluxo das células coletadas após 15 minutos (A), 24 horas (B), 48 horas (C), 72 horas (D), 96 horas (E) e 7 dias (F) pós-infecção (n=1), em gráficos para marcação de LIVE/DEAD (Texas-red).

4.8 Análise de quimiocinas e citocinas por CBA após pré-tratamento e infecção por ZIKV

Dosamos as quimiocinas CXCL10, CCL2, CXCL8, CXCL9 e CCL5 e as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF no sobrenadante das culturas pré-tratadas e infectadas. O agonista de TLR3 levou ao aumento de todas as quimiocinas (Fig. 12 A-E), especialmente CXCL10 (Fig. 12A) e CCL2 (Fig. 12B), nos quais vemos o aumento da quimiocina já 15 min pós-infecção. Além disso, o agente de transfecção (LyoVec) pareceu seguir o mesmo perfil que o Poly I:C, com exceção em CCL2 já que teve uma queda em 96h. Importante ressaltar que para as quimiocinas CXCL10, CCL2 e CXCL8 (Fig. 12 A-C), tanto as células pré-tratadas com Poly:I:C, assim como o seu controle (LyoVec), excederam o limite de detecção da curva do CBA, sendo que esse efeito foi observado mais precocemente no grupo Poly I:C.

A NAR, por sua vez, seguiu o mesmo perfil de produção de quimiocinas que o grupo infectado (ZIKV), não apresentando efeito na modulação dessas quimiocinas frente a infecção.

Em relação as citocinas, o Poly I:C e o LyoVec tiveram perfis parecidos, com aumentos significativos em relação ao não infectado, sendo que o aumento induzido por Poly I:C é sempre mais expressivo precocemente. Além disso, o infectado e o tratado com NAR, também seguiram o mesmo perfil de produção de citocinas.

Podemos observar que 15 min pós-infecção, em todas as condições infectadas e/ou tratadas, há o aumento de TNF (Fig. 13D) e após 48h começa a diminuir. Também para IL-1 β (Fig. 13A) e IL-6 (Fig. 13B) esse mesmo fenômeno ocorre 15 min p.i., contudo, com o tempo a secreção tende a aumentar. Já em IL-10 (Fig. 13C), a produção da citocina é vista após 24h, com aumentos significativos por Poly I:C e LyoVec, e a partir de 72h sofrem uma queda.

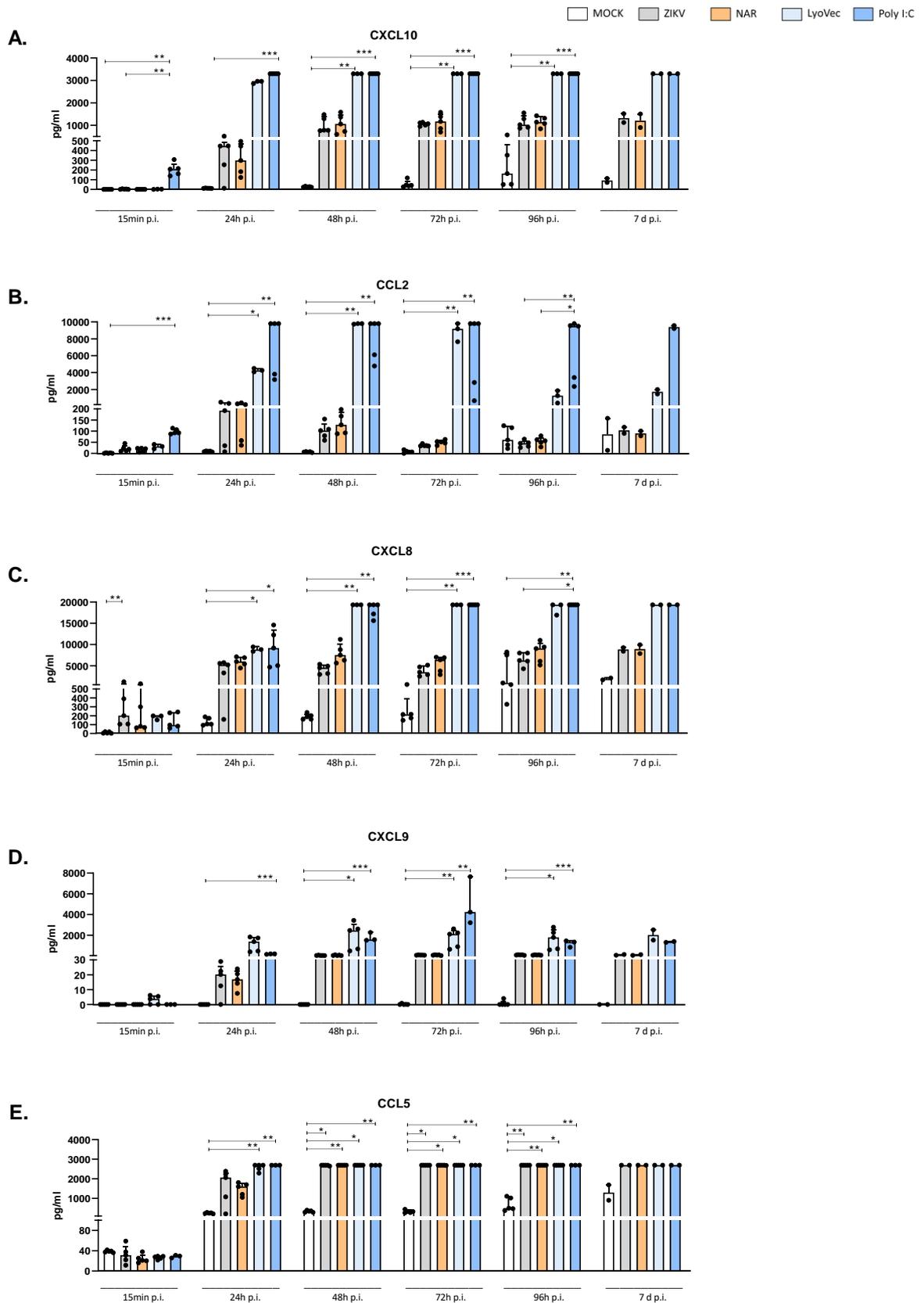


Figura 12. Produção de quimiocinas após infecção é aumentada pelo tratamento das células THP-1 com Poly I:C ou com LyoVec. Concentrações das quimiocinas CXCL10 (A),

CCL2 (B), CXCL8 (C), CXCL9 (D) e CCL5 (E), presentes no sobrenadante de cultura de células THP-1 pré-tratadas com NAR, LyoVec ou Poly I:C e infectadas. Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. * $p \leq 0,05$.

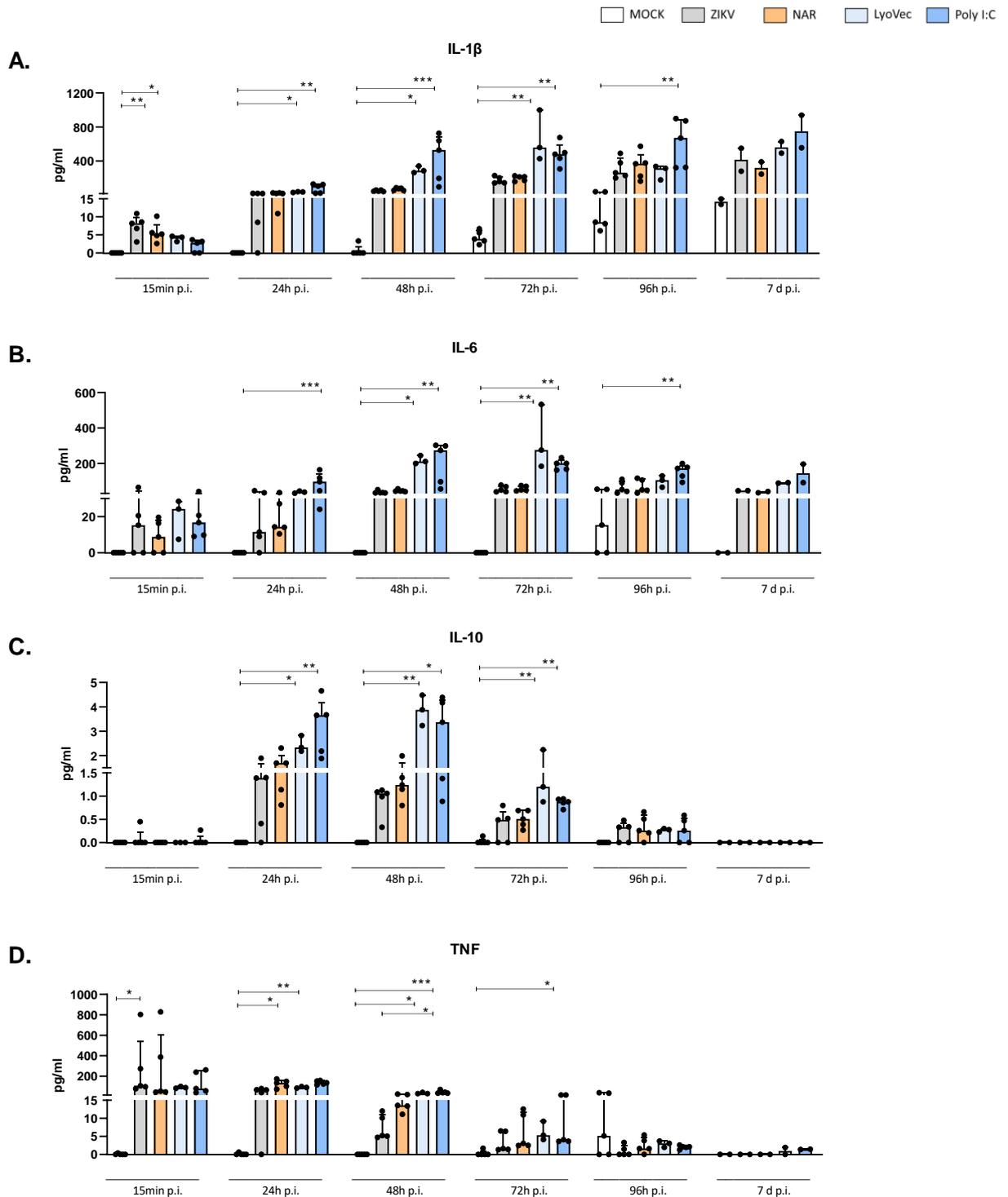


Figura 13. Produção de citocinas das células THP-1 pré-tratadas e infectadas. Concentrações das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C) e TNF (D), presentes no sobrenadante de cultura de células THP-1 pré-tratadas com NAR, LyoVec ou Poly I:C e infectadas. Os dados foram expressos por mediana e intervalo interquartil. * $p \leq 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Já foi descrito que o ZIKV possui mecanismos de evasão do sistema imunológico que diminuem a produção de fatores antivirais (GRANT; PONIA; TRIPATHI; BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2016; LUNDBERG; MELÉN; WESTENIUS; JIANG *et al.*, 2019; RIEDL; ACHARYA; LEE; LIU *et al.*, 2019), além de induzir a produção de EROS, aumentando a inflamação e dano tecidual (ALMEIDA; FERRAZ; DA SILVA CAETANO; DA SILVA MENEGATTO *et al.*, 2020). Sendo assim, fizemos o uso dos agonistas de RIG-I, Poly I:C e da naringenina e avaliamos seu efeito antiviral, antioxidante e anti-inflamatório.

Para isso, começamos padronizando as doses de uso dos estimulantes, o tempo de tratamento e quais fatores, quimiocinas e citocinas que iríamos dosar, de acordo com o efeito modulador de cada estímulo.

Com relação a viabilidade, como não tínhamos quantidade de células suficientes para testar todas as doses de estímulos, optamos por testar a maior dose de cada estímulo em culturas de 24 e 48 horas. Vimos que, apesar do Poly I:C transfectado, utilizando o LyoVec, ter diminuído a viabilidade celular, não foi um resultado significativo. Isso mostra que todos os agonistas testados e a NAR, poderiam ser utilizados nos próximos experimentos já que tiveram nenhum ou pouco efeito citotóxico.

Quando analisamos a expressão de mRNA de fatores antivirais, notamos que o agonista de RIG-I talvez não seja um bom estímulo para THP-1, já que tanto no período de 12 horas, como em 24 horas não observamos diferenças relevantes entre o agonista e seu controle negativo. Quanto ao Poly I:C transfectado, observamos um efeito positivo na THP-1 já que foi o agonista que mais levou a expressão de fatores antivirais, e também da produção de quimiocinas e da citocina IL-8. O mesmo não foi visto nas células em que o Poly I:C não estava acompanhado do agente de transfecção. Dessa forma, definimos que o Poly I:C teria um maior destaque no projeto sendo um agonista muito utilizado em estudos com vírus.

É importante ressaltar que, quando analisamos a expressão dos genes alvos no tempo de 12 horas após estímulo, notamos que, de maneira geral, há uma maior expressão de todos os fatores avaliados, quando comparado com o tempo de 24

horas. Mesmo ao analisar 4 horas após o estímulo, vimos que 12 horas é o melhor tempo, com exceção de IRF3 que mostrou ser um gene mais precoce.

Na análise da produção de quimiocinas e citocinas, conforme dito anteriormente, podemos destacar, no contexto da ativação antiviral, a secreção de CXCL10 aumentada após o estímulo de Poly I:C transfectado, visto que a produção dessa quimiocina é dependente de interferon (QI; KIM; YOON; JIN *et al.*, 2009). Dessa forma, conseguimos evidenciar a capacidade desse estímulo em ativar vias produtoras de interferon, muito importantes para respostas contra o ZIKV (YONEYAMA; ONOMOTO; JOGI; AKABOSHI *et al.*, 2015) (CUGOLA; FERNANDES; RUSSO; FREITAS *et al.*, 2016).

Em relação às citocinas pró- (IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF) e anti-inflamatórias (IL-10), notamos que esses estímulos não foram eficazes em induzir a THP-1 na produção dessas citocinas, visto que, mesmo utilizando kits de CBA de alta sensibilidade, não conseguimos detectá-las nos sobrenadantes de cultura celular.

Antes que pudéssemos seguir para infecção com ZIKV, consideramos testar se os macrófagos iriam responder melhor ao tratamento, em questão a expressão de fatores antivirais e antioxidantes. Para isso, utilizamos o protocolo de diferenciação de THP-1 em macrófagos com PMA, que foram tratados e analisados 4 e 12h pós-tratamento, considerando que 24h é um tempo muito tardio. Foi visto um perfil de resposta parecido entre a THP-1 e macrófagos para fatores antivirais, sendo a única diferença a expressão de MDA5 para macrófagos, a qual só é aumentada na THP-1 em 12h de estímulo com Poly I:C. Enquanto para fatores antioxidantes, não foi vista grandes diferenças entre os dois modelos celulares, apresentando um discreto aumento de SOD2 nos macrófagos, mas independente do tratamento com NAR, possivelmente pelo estresse que é gerado pelo PMA na diferenciação. Achamos que outras análises com macrófago deveriam ser feitas, mas por agora decidimos manter a THP-1 como modelo de infecção.

As células THP-1 foram infectadas com ZIKV e a carga viral foi quantificada na célula e no sobrenadante. Curiosamente o vírus detectado nas células depois de 24h sofre uma queda acentuada, enquanto no sobrenadante se manteve mais estável durante o tempo. Isso nos levou a questionar se o vírus estava sendo replicado. Pela microscopia vimos o efeito citopático do vírus 72h pós-infecção e pelo ensaio de

viabilidade confirmamos que o vírus estava infectando a célula, já que a partir de 96h pós-infecção observamos diminuição da viabilidade e em 7 dias vemos a morte de todas as células.

Por meio da literatura disponível, observamos que o vírus sempre é dosado pelo sobrenadante e que as cargas virais obtidas não costumam ser muito altas, mas todos confirmam que a replicação do ZIKV na THP-1 ocorre e que o efeito citopático se vê em tempos mais tardios (JEONG; LEE; KIM; LYU *et al.*, 2023; LIMA; AZEVEDO; DE MORAIS; DE SOUSA *et al.*, 2021). Ainda temos mais amostras a serem dosadas, mas com base nos nossos resultados e pela pesquisa na literatura, podemos afirmar que ocorreu a infecção.

Além disso, a partir da microscopia optamos pelo MOI 1 para os ensaios seguintes, já que mesmo dosando mais vírus no sobrenadante com o MOI 2,5, o efeito citopático observado era o mesmo. Dessa forma, poderíamos obter os resultados esperados utilizando menos vírus. Contudo, consideramos usar um MOI menor futuramente pois com 7 dias ocorreu a morte de toda a população.

Pelo ensaio de viabilidade, pudemos avaliar também o efeito do pré-tratamento com agonista de TLR3 ou NAR. Nos experimentos anteriores, vimos que havia aumento da morte celular ao usar o LyoVec como agente de transfecção, por isso, adicionamos ele como um controle negativo do Poly I:C. Tínhamos visto que a transfecção do Poly I:C induzia morte após 48h, mas de maneira bastante discreta, já o pré-tratamento com o agonista diminuiu a viabilidade a partir de 24h pós infecção. O LyoVec sozinho também teve um grande impacto na viabilidade. Isso nos levou a hipótese de que o agente de transfecção excedente no meio de cultura após o tratamento das células poderia estar ajudando o vírus a entrar na célula, o que explicaria a morte celular mais precoce frente ao grupo infectado sem o pré-tratamento. Contudo, outras análises são necessárias para investigar essa possibilidade.

Também observamos que a NAR não teve efeito na viabilidade celular, já que manteve o padrão da cultura só infectada, ou seja, não apresentou proteção contra o efeito citopático causado pelo ZIKV. Já demonstraram o efeito da NAR na diminuição da replicação do ZIKV *in vitro* (CATANEO; KUCZERA; KOISHI; ZANLUCA *et al.*,

2019), sendo necessário ainda realizarmos a quantificação viral das células pré-tratadas com o flavonoide.

No primeiro CBA realizado, destacamos o aumento da secreção de CXCL10 pelo Poly I:C. O pré-tratamento com o agonista, confirmou nosso achado, já que levou ao aumento dessa quimiocina quando comparado com a cultura só infectada. Além disso, o LyoVec sozinho também levou ao aumento de todas quimiocinas e citocinas, assim como o Poly I:C, apoiando nossa hipótese que o agente de transfecção estaria ajudando o ZIKV a infectar a célula.

Em relação às citocinas, tínhamos visto que o tratamento sozinho com Poly I:C ou NAR não foi capaz de induzir a produção de citocinas pró- (IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF) e anti-inflamatórias (IL-10). Ao infectar a THP-1, o vírus levou ao aumento de todas as citocinas analisadas (IL-1 β , IL-6, TNF e IL-10) e o pré-tratamento com agonista de TLR3 contribui para o aumento, principalmente de IL-1 β , IL-6 e IL-10. Também observamos que a NAR não teve efeito modulatório, já que teve o mesmo perfil de produção de quimiocinas e citocinas que o infectado.

Ainda temos análises que precisam ser feitas para delinear melhor os resultados. Precisamos entender o efeito do agonista de TLR3 e da NAR na replicação do vírus e a produção dos fatores antivirais e antioxidantes das culturas infectadas e pré-tratadas, de forma a tentar avaliar a capacidade antioxidante da NAR e antiviral do Poly I:C. Também consideramos utilizar o agonista de RIG-I, que não foi incluído nos ensaios com infecção, pois já foi visto que o tratamento com agonista de RIG-I restringe a replicação viral do ZIKV em células dendríticas (BOWEN; QUICKE; MADDUR; O'NEAL *et al.*, 2017). Além disso, a possível contribuição do agente de transfecção LyoVec na infecção por ZIKV precisa ser investigado.

6 CONCLUSÃO

Considerando nossos resultados, podemos concluir que, apesar do Poly I:C induzir a expressão de fatores antivirais e produção de citocinas, não foi capaz de inibir o efeito citopático do ZIKV. Quanto à naringenina, apesar de ter potencial anti-inflamatório, não mostrou modulação quanto a produção de citocinas e quimiocinas no contexto de infecção, além de não ter protegido contra a morte celular.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. F. P. M.; SOUZA, W. V.; ARAÚJO, T. V. B.; BRAGA, M. C. *et al.* The microcephaly epidemic and Zika virus: building knowledge in epidemiology. **Cad Saude Publica**, 34, n. 10, p. e00069018, 10 11 2018.

ALMEIDA, L. T.; FERRAZ, A. C.; DA SILVA CAETANO, C. C.; DA SILVA MENEGATTO, M. B. *et al.* Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities in vitro and in vivo. **Virus Res**, 286, p. 198084, 09 2020.

BHARDWAJ, U.; PANDEY, N.; RASTOGI, M.; SINGH, S. K. Gist of Zika Virus pathogenesis. **Virology**, 560, p. 86-95, 08 2021.

BOWEN, J. R.; QUICKE, K. M.; MADDUR, M. S.; O'NEAL, J. T. *et al.* Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. **PLoS Pathog**, 13, n. 2, p. e1006164, Feb 2017.

CATANEO, A. H. D.; KUCZERA, D.; KOISHI, A. C.; ZANLUCA, C. *et al.* The citrus flavonoid naringenin impairs the in vitro infection of human cells by Zika virus. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 16348, 11 08 2019.

CUGOLA, F. R.; FERNANDES, I. R.; RUSSO, F. B.; FREITAS, B. C. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, 534, n. 7606, p. 267-271, Jun 09 2016.

GRANT, A.; PONIA, S. S.; TRIPATHI, S.; BALASUBRAMANIAM, V. *et al.* Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host Microbe**, 19, n. 6, p. 882-890, Jun 08 2016.

HAMEL, R.; DEJARNAC, O.; WICHIT, S.; EKCHARIYAWAT, P. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **J Virol**, 89, n. 17, p. 8880-8896, Sep 2015.

HERTZOG, J.; DIAS JUNIOR, A. G.; RIGBY, R. E.; DONALD, C. L. *et al.* Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. **Eur J Immunol**, 48, n. 7, p. 1120-1136, Jul 2018.

JAGGER, B. W.; MINER, J. J.; CAO, B.; ARORA, N. *et al.* Gestational Stage and IFN- λ Signaling Regulate ZIKV Infection In Utero. **Cell Host Microbe**, 22, n. 3, p. 366-376.e363, Sep 2017.

JAVED, F.; MANZOOR, K. N.; ALI, M.; HAQ, I. U. *et al.* Zika virus: what we need to know? **J Basic Microbiol**, 58, n. 1, p. 3-16, Jan 2018.

JEONG, G. U.; LEE, S.; KIM, D. Y.; LYU, J. *et al.* Zika Virus Infection Induces Interleukin-1 β -Mediated Inflammatory Responses by Macrophages in the Brain of an Adult Mouse Model. **J Virol**, 97, n. 6, p. e0055623, Jun 29 2023.

KINDHAUSER, M. K.; ALLEN, T.; FRANK, V.; SANTHANA, R. S. *et al.* Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bull World Health Organ**, 94, n. 9, p. 675-686C, Sep 01 2016.

LEONHARD, S. E.; MANDARAKAS, M. R.; GONDIM, F. A. A.; BATEMAN, K. *et al.* Diagnosis and management of Guillain-Barré syndrome in ten steps. **Nat Rev Neurol**, 15, n. 11, p. 671-683, Nov 2019.

LI, A.; WANG, W.; WANG, Y.; CHEN, K. *et al.* NS5 Conservative Site Is Required for Zika Virus to Restrict the RIG-I Signaling. **Front Immunol**, 11, p. 51, 2020.

LIMA, M. C.; AZEVEDO, E. A. N.; DE MORAIS, C. N. L.; DE SOUSA, L. I. O. *et al.* The P-MAPA Immunomodulator Partially Prevents Apoptosis Induced by Zika Virus Infection in THP-1 Cells. **Curr Pharm Biotechnol**, 22, n. 4, p. 514-522, 2021.

LUNDBERG, R.; MELÉN, K.; WESTENIUS, V.; JIANG, M. *et al.* Zika Virus Non-Structural Protein NS5 Inhibits the RIG-I Pathway and Interferon Lambda 1 Promoter Activation by Targeting IKK Epsilon. **Viruses**, 11, n. 11, 11 04 2019.

MARTINES, R. B.; BHATNAGAR, J.; KEATING, M. K.; SILVA-FLANNERY, L. *et al.* Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses--Brazil, 2015. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 65, n. 6, p. 159-160, Feb 19 2016.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host Microbe**, 21, n. 2, p. 134-142, Feb 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiental. Situação epidemiológica da síndrome associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2022**, 2023.

MWALIKO, C.; NYARUABA, R.; ZHAO, L.; ATONI, E. *et al.* Zika virus pathogenesis and current therapeutic advances. **Pathog Glob Health**, 115, n. 1, p. 21-39, Feb 2021.

NGONO, A. E.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annu Rev Immunol**, 36, p. 279-308, 04 2018.

NINFALI, P.; ANTONELLI, A.; MAGNANI, M.; SCARPA, E. S. Antiviral Properties of Flavonoids and Delivery Strategies. **Nutrients**, 12, n. 9, Aug 21 2020.

PIELNAA, P.; AL-SAADAWA, M.; SARO, A.; DAMA, M. F. *et al.* Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, 543, p. 34-42, Apr 2020.

PINGEN, M.; BRYDEN, S. R.; PONDEVILLE, E.; SCHNETTLER, E. *et al.* Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. **Immunity**, 44, n. 6, p. 1455-1469, Jun 21 2016.

PLOCIENNIKOWSKA, A.; FRANKISH, J.; MORAES, T.; DEL PRETE, D. *et al.* TLR3 activation by Zika virus stimulates inflammatory cytokine production which dampens the antiviral response induced by RIG-I-like receptors. **J Virol**, Mar 03 2021.

QI, X. F.; KIM, D. H.; YOON, Y. S.; JIN, D. *et al.* Essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TNF-alpha in CXCL10 production in human THP-1 monocytes. **J Cell Physiol**, 220, n. 3, p. 690-697, Sep 2009.

RASMUSSEN, S. A.; JAMIESON, D. J. Teratogen update: Zika virus and pregnancy. **Birth Defects Res**, 112, n. 15, p. 1139-1149, 09 2020.

RIEDL, W.; ACHARYA, D.; LEE, J. H.; LIU, G. *et al.* Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG-I- and MDA5-Mediated Innate Immunity. **Cell Host Microbe**, 26, n. 4, p. 493-503.e496, Oct 09 2019.

RODRIGUES DE SOUSA, J.; AZEVEDO, R. D. S. D.; QUARESMA, J. A. S.; VASCONCELOS, P. F. D. C. The innate immune response in Zika virus infection. **Rev Med Virol**, 31, n. 2, p. e2166, Mar 2021.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; CULQUICHICÓN, C. The need for enhancing the message: Screening for Zika, STORCH, and other agents and co-infections should be considered and assessed. **Am J Reprod Immunol**, 78, n. 1, Jul 2017.

SCHILLING, M.; BRIDGEMAN, A.; GRAY, N.; HERTZOG, J. *et al.* RIG-I Plays a Dominant Role in the Induction of Transcriptional Changes in Zika Virus-Infected Cells, which Protect from Virus-Induced Cell Death. **Cells**, 9, n. 6, 06 16 2020.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE, MS. Centro de Informações Estratégicas de Informações em Saúde. **Boletim Epidemiológico Síndromes Congênitas 2015-2021**, 2021.

SONG, B. H.; YUN, S. I.; WOOLLEY, M.; LEE, Y. M. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **J Neuroimmunol**, 308, p. 50-64, Jul 15 2017.

TORRES, R. J. A.; LUCHINI, A.; FERREIRA, A. L. D. A. The nuclear factor E2-related factor 2 and age-related macular degeneration. **Arq Bras Oftalmol**, Mar 07 2022.

VAN DEN POL, A. N.; MAO, G.; YANG, Y.; ORNAGHI, S. *et al.* Zika Virus Targeting in the Developing Brain. **J Neurosci**, 37, n. 8, p. 2161-2175, Feb 2017.

YONEYAMA, M.; ONOMOTO, K.; JOGI, M.; AKABOSHI, T. *et al.* Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. **Curr Opin Immunol**, 32, p. 48-53, Feb 2015.

ZANOTTO, P. M. A.; LEITE, L. C. C. The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. **Front Immunol**, 9, p. 1964, 2018.