

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular**

Danielle Cunha Teixeira

**PAPEL DA FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE  $\gamma$  NA PATOGÊNESE DA  
INFECÇÃO PELO *ZIKA VIRUS***

Belo Horizonte

2024

Danielle Cunha Teixeira

**PAPEL DA FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE  $\gamma$  NA PATOGÊNESE DA  
INFECÇÃO PELO *ZIKA VIRUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase em Biologia Celular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vivian Vasconcelos Costa

Coorientador: Dr Gabriel Campolina Silva

Belo Horizonte

2024

043

Teixeira, Danielle Cunha.

Papel da fosfatidilinositol 3-quinase  $\gamma$  na patogênese da infecção pelo Zika vírus [manuscrito] / Danielle Cunha Teixeira. – 2024.

86 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa Dra Vivian Vasconcelos Costa. Coorientador: Dr Gabriel Campolina Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Zika virus. 3. Doenças Neuroinflamatórias. 4. Sistema Nervoso Central. 5. Fosfatidilinositol 3-Quinases. I. Costa, Vivian Vasconcelos. II. Silva, Gabriel Campolina. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE DANIELLE CUNHA TEIXEIRA

Às **nove horas** do dia **23 de agosto de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**PAPEL DA FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE Y NA PATOGENESE DA INFECÇÃO PELO ZIKA VIRUS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Vivian Vasconcelos Costa**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Vivian Vasconcelos Costa	UFMG	APROVADA
Dr. Renato Santana de Aguiar	UFMG	APROVADA
Dra. Vanessa Pinho da Silva	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Dr<sup>a</sup>. Vivian Vasconcelos Costa \_\_\_\_\_

Dr. Renato Santana de Aguiar \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Vanessa Pinho da Silva \_\_\_\_\_

Belo Horizonte, 26 de agosto de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Pinho da Silva, Professora do Magistério Superior**, em 26/08/2024, às 12:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 26/08/2024, às 16:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabricio Rodrigues dos Santos, Professor do Magistério Superior**, em 20/02/2025, às 13:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3493198** e o código CRC **B4D0E179**.

*Dedico este trabalho às seguintes pessoas:*

*À Deus, por ter me dado força para me manter firme nessa jornada.*

*À minha mãe, Sueli, pelo amor incondicional, pelo cuidado, dedicação e confiança.*

*Ao meu pai, Carlos, por ser meu maior exemplo de pessoa tanto na vida pessoal quanto profissional, de força e luta.*

*À minha irmã, Stefani, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.*

*Aos meus amigos presentes em todos os momentos, por todo o incentivo.*

*À minha orientadora Vivian, pelo aprendizado, amizade e pelo exemplo de amor à profissão.*

*Meu coorientador Gabriel, por toda disposição em compartilhar seu conhecimento.*

## **AGRADECIMENTOS**

Em momentos como esse, em que finalizamos etapas importantes da nossa vida, é que percebemos como somos gratos a tantas pessoas que de maneira direta ou indireta nos ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço a Deus, por sempre cuidar de mim e da minha família, por me guiar, dar forças em todos os momentos da minha vida, por todas minhas conquistas e realizações e por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

À minha mãe, porque sem ela nada seria possível. Ela, que sempre esteve ao meu lado, apoiando emocionalmente e cuidando de mim com todo carinho do mundo. Muito obrigada, mãe, por todos os mimos, por aconselhar e acreditar. Esta conquista é sua e do meu pai!

Ao meu pai, que é a fonte de toda a minha inspiração e força, a pessoa que mais me incentiva a seguir meus sonhos, a que mais me aconselha e que confia em mim. Obrigada por tudo, pai, devo tudo a você e à minha mãe.

À minha irmã, por estar sempre presente, pela amizade, por ser minha companheira em todos os momentos, por sempre me ajudar e torcer por mim. Obrigada pela força e pelo amor compartilhado.

Ao meu namorado, por ser tão disposto e prestativo, estar sempre presente, e por seu constante incentivo. Agradeço por compartilhar nossos sonhos e por tornar minha vida mais leve e menos rotineira.

Aos meus amigos, em especial a Ana Clara, Amanda e Isadora, por todo carinho e suporte em todos os momentos na minha vida.

Agradeço à Vivi, minha orientadora, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim ao longo desses 7 anos. Sou imensamente grata por seu acolhimento, motivação e por despertar em mim ainda mais uma paixão pesquisa científica. Agradeço também pela amizade, pela força e compreensão, pelos conselhos e pelo aprendizado. Você é um exemplo de pessoa, pesquisadora e professora para mim.

O meu coorientador Gabriel, pela coorientação, pelo apoio e ensinamentos que foram importantes para o sucesso do meu projeto.

Aos integrantes do Grupo de pesquisa em arboviroses ou Grupo do imunofar: Fernanda Marim, Celso, Ingredy, Felipe rocha, Luiz, Fernanda Tana, Jordane, Matheus, Jenniffer, Victor, Felipe rocha Jr, Viviane, Vinicius, Debora e Manuela por tantas horas de trabalho compartilhado, pelo convívio diário, pela troca de

conhecimento e companheirismo. Sou muito grata por toda a ajuda.

Ao Felipe Rocha, Fernanda Tana e Luiz, especialmente, pela amizade de todos esses anos, por todas as conversas, todos os momentos, todos os almoços, apoio e companheirismo. Sou eternamente grata a vocês, vocês tornam o trabalho muito mais leve, tornam os dias muito mais felizes, até mesmo nos momentos mais difíceis. São amizades do trabalho que vou levar para a vida inteira. Obrigada.

Ao Celso e à Fernanda Marim, agradeço pelo aprendizado, pelas correções de trabalhos, pelas discussões e esclarecimentos de dúvidas, pelas conversas prazerosas e pelo apoio. Grande parte do que sei hoje é resultado do ensinamento de vocês.

À Ilma, Rose, Leticia e ao Hermes pelo apoio técnico.

Aos professores Vanessa, Aline, Mauro, Fred e Dani pelo acolhimento.

À CAPES, CNPq, Fapemig, INCT em dengue e PRONEX, pelo suporte financeiro.

Aos professores Renato Santana e Vanessa Pinho por aceitarem fazer parte da banca.

## RESUMO

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus emergente da família Flaviviridae e do gênero Orthoflavivirus, com tropismo para o sistema nervoso central (SNC), onde desencadeia uma série de danos celulares ao sistema nervoso (SN) incluindo neuroinflamação e neurodegeneração. Devido à sua confirmada associação com a microcefalia e outras complicações neurológicas, o ZIKV é considerado um vírus de importância de saúde pública global. Sabe-se que o ZIKV utiliza mecanismos celulares para se multiplicar nas células do hospedeiro e inibir a apoptose, incluindo a estimulação de vias de sobrevivência tais como a via PI3K/AKT. Este estudo teve como objetivo avaliar o impacto da via da fosfatidilinositol 3-quinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) durante a infecção pelo ZIKV. A PI3K $\gamma$  é uma quinase amplamente distribuída no cérebro e em leucócitos e exerce um papel vital em vários processos celulares, como a diferenciação, o recrutamento, e a sobrevivência celular. Para isso, culturas primárias de neurônios derivados de camundongos deficientes em PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma$ kd/kd) ou culturas imortalizadas de neuroblastoma humano SH-SY5Y foram tratadas com o inibidor da via PI3K $\gamma$  AS605240 e infectadas com o ZIKV. Para investigar o envolvimento da via PI3K $\gamma$  no processo neuroinflamatório desencadeado pelo ZIKV, camundongos deficientes para o receptor de interferons do tipo I  $\alpha/\beta$  (A129) foram tratados com o inibidor seletivo AS605240 antes ou depois da infecção pelo ZIKV. Os resultados demonstraram que tanto o bloqueio farmacológico quanto a deficiência de PI3K $\gamma$  inibem a replicação do ZIKV e a morte neuronal *in vitro*. Da mesma forma, camundongos tratados com o inibidor de PI3K $\gamma$  mostraram maior proteção contra a infecção pelo ZIKV *in vivo*, resultando em menor replicação viral e lesões cerebrais mais brandas. Este fenótipo neuroprotetor foi associado à modulação diferencial da ativação de astrócitos e micróglia, com redução da produção de TNF nas microglia ativadas. Além disso, a inibição da via PI3K $\gamma$  preveniu o influxo e a ativação de células T CD8<sup>+</sup>, bem como a produção de mediadores pró-inflamatórios como IFN- $\gamma$  e IL-17 no tecido cerebral de camundongos infectados pelo ZIKV. Nossas descobertas sugerem que a ativação da via PI3K $\gamma$  contribui para a replicação do ZIKV e indução da neuroinflamação, destacando um potencial terapêutico desta via na mitigação dos danos associados à infecção pelo ZIKV no SN.

Palavras-chave: Vírus Zika (ZIKV); Neuroinflamação; SNC; Via PI3K/AKT; PI3K $\gamma$ .

## ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an emerging arbovirus of the Flaviviridae family and Orthoflavivirus genus, with tropism for the central nervous system (CNS), where it triggers a series of cellular damages to the nervous system (NS) including neuroinflammation and neurodegeneration. Due to its confirmed association with microcephaly and other neurological complications, ZIKV is considered a virus of global public health importance. ZIKV is known to utilize cellular mechanisms to multiply in host cells and inhibit apoptosis, including the stimulation of survival pathways such as the PI3K/AKT pathway. This study aimed to evaluate the impact of the phosphatidylinositol 3-kinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) pathway during ZIKV infection. PI3K $\gamma$  is a kinase widely distributed in the brain and leukocytes and plays a vital role in several cellular processes, such as differentiation, recruitment, and cell survival. For this purpose, primary cultures of neurons derived from PI3K $\gamma$ -deficient mice (PI3K $\gamma$ kd/kd) or immortalized cultures of human neuroblastoma SH-SY5Y were treated with the PI3K $\gamma$  pathway inhibitor AS605240 and infected with ZIKV. To investigate the involvement of the PI3K $\gamma$  pathway in the neuroinflammatory process triggered by ZIKV, mice deficient for the type I interferon receptor  $\alpha/\beta$  (A129) were treated with the selective inhibitor AS605240 before or after ZIKV infection. The results demonstrated that both pharmacological blockade and PI3K $\gamma$  deficiency inhibit ZIKV replication and neuronal death in vitro. Similarly, mice treated with the PI3K $\gamma$  inhibitor showed greater protection against ZIKV infection in vivo, resulting in reduced viral replication and milder brain lesions. This neuroprotective phenotype was associated with differential modulation of astrocyte and microglia activation, with reduced TNF production in activated microglia. Furthermore, inhibition of the PI3K $\gamma$  pathway prevented the influx and activation of CD8<sup>+</sup> T cells, as well as the production of pro-inflammatory mediators such as IFN- $\gamma$  and IL-17 in the brain tissue of ZIKV-infected mice. Our findings suggest that activation of the PI3K $\gamma$  pathway contributes to ZIKV replication and induction of neuroinflammation, highlighting a therapeutic potential of this pathway in mitigating damage associated with ZIKV infection in the SN.

Keywords: Zika virus (ZIKV); Neuroinflammation; CNS; PI3K/AKT pathway; PI3K $\gamma$ .

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cenário epidemiológico mundial do ZIKV.....	17
Figura 2: Esquema dos ciclos de transmissão do Zika Virus.....	19
Figura 3. Estrutura das partículas do ZIKV .....	21
Figura 4. Representação do genoma e da poliproteína do ZIKV.....	22
Figura 5. Ciclo de multiplicação do ZIKV.....	24
Figura 6. Reações catalisadas por PI3Ks.....	31
Figura 7. Esquema da via de sinalização PI3K/AKT.....	32
Figura 8. Esquema representativo para avaliar o papel da via PI3Ky durante a infecção pelo ZIKV em cultura de neurônios primários.....	39
Figura 9: Esquema representativo para avaliar a fosforilação da AKT em diferentes tempos de infecção pelo ZIKV.....	40
Figura 10. Representação esquemática para avaliar o papel do inibidor AS605240 durante a infecção pelo ZIKV.....	41
Figura 11. Representação esquemática da estratégia experimental para avaliar os efeitos terapêuticos do inibidor PI3Ky AS605240 e a expressão de pAKT.....	45
Figura 12. Cultivo de neurônios deficientes para PI3Ky apresentam reduzida carga viral e morte celular após infecção pelo ZIKV.....	48
Figura 13. O inibidor da via PI3Ky melhora os parâmetros clínicos, reduz os títulos virais e a lesão cerebral em camundongos A129 infectados pelo ZIKV .....	50
Figura 14. O tratamento com inibidor de PI3Ky reduziu a ativação de células inflamatórias no cérebro induzida pela infecção por ZIKV.....	52
Figura 15. O tratamento com inibidor de PI3Ky não alterou o aumento de citocinas e quimiocinas induzida durante a infecção pelo ZIKV.....	53
Figura 16. O inibidor da via PI3Ky diminui a ativação microglial e a produção de TNF induzida pela infecção pelo ZIKV.....	61
Figura 17. A infecção pelo ZIKV e a inibição da via da PI3Ky não alteraram a ativação ou liberação de mediadores em outros tipos células mieloides.....	62
Figura 18. O tratamento com inibidor da via PI3Ky diminui a ativação de CD8 T e a produção de IFN- $\gamma$ e IL-17 desencadeada pela infecção pelo ZIKV.....	64

Figura .19 Efeitos da infecção pelo ZIKV e do inibidor PI3K $\gamma$ nas populações de células linfoides e na produção de citocinas pró-inflamatórias.....	65
Figura 20. A administração terapêutica com o inibidor da via PI3K $\gamma$ reduz os títulos virais, a lesão e a inflamação induzidas pelo ZIKV.....	67
Figura 21. Redução da morte neuronal e do título viral em neuroblastomas humanos (SH-SY5Y).....	68

## LISTA DE TABELA

Tabela 1.....	23
---------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADE** - Antibody-dependent enhancement

**AKT** - Proteína quinase serina-treonina

**CDC** - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

**CHIKV** - Chikungunya

**DENV** - Vírus da dengue

**DMEM** - Meio de Eagle modificado por Dulbecco

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DC-SIGN** - Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin

**ELISA** - Ensaio de imunoabsorção enzimática **GPCRs** - Receptores acoplados à proteína G **IFN** - Interferon

**IFN- $\alpha/\beta$ R -/-** - Receptor de interferon do tipo I

**Ig** - Imunoglobulina

**JEV** - Vírus da encefalite japonesa **LDH** - Lactato Desidrogenase **mRNA** - RNA mensageiro

**NaCl** - Cloreto de sódio

**NS1-5** - Proteínas não estruturais 1 a 5 **OMS** - Organização Mundial da Saúde **PIO** - Pressão intraocular

**PBS** - Tampão fosfato-salino

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase **PFU** - Unidade formadora de placas **PI3K** - Fosfatidilinositol 3 quinase **PI3K $\gamma$**  - Fosfatidilinositol 3 quinase  $\gamma$  **PKB** - Proteína quinase B

**RNA** - Ácido ribonucleico

**RE** - Retículo endoplasmático

**RT-PCR** - Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa

**RTK** - Receptores tirosina quinase **SCZ** - Síndrome Congênita do Zika **SGB** - Síndrome de Guillain-Barré **SFB** - Soro Fetal Bovino

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**TAM** - Tirosina quinase

**TIM1** - T-cell Immunoglobulin and Mucin domain 1

**WNV** - West Nile Virus

**YFV** - Vírus da Febre Amarela

**ZIKV** - Vírus da Zika

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 Breve histórico e contexto atual da Zika.....	16
1.2 Transmissão do Zika vírus.....	18
1.3 O Zika vírus.....	20
1.4 Ciclo de multiplicação.....	22
1.5 Manifestações clínicas e patogênese.....	25
1.6 Fosfatidilinositol 3-quinase $\gamma$ .....	29
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>35</b>
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivo específico.....	36
<b>4.METODOLOGIA.....</b>	<b>37</b>
4.1 Animais.....	37
4.2 Vírus.....	37
4.3 Tratamento.....	38
4.4 Protocolos do ensaio de cultura de neurônios primários e de morte celular (Live/Dead).....	39
4.5 Experimentação animal, parâmetros clínicos, eutanásia e coleta das amostras.....	40
4.6 Determinação dos títulos virais pelo método de Unidades formadoras de placas.....	41
4.7 Dosagem de citocinas por ELISA.....	42
4.8 Histopatologia e Imunohistoquímica.....	43
4.9 Citometria de Fluxo.....	44
4.10 Cultura de Neuroblastoma e ensaio de citotoxicidade.....	45
4.11 Ensaio de lactato-desidrogenase (LDH).....	46
4.12 Análise Estatística.....	46
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
5.1 Redução da morte neuronal e do título viral em neurônios derivados de embriões knockout para a enzima catalítica PI3K $\gamma$ <sup>kd/kd</sup> .....	46
5.2 A inibição do PI3K $\gamma$ melhora os resultados da doença induzidos por camundongos A129 infectados pelo ZIKV.....	48
5.3 A inibição da PI3K $\gamma$ reduz a neuroinflamação induzida pelo ZIKV sem alterar os	

níveis de citocinas.....	51
5.4 A inibição da PI3Ky suprime a ativação celular induzida pela infecção pelo ZIKV.....	54
5.4.1Populações de células mieloides.....	54
5.4.2Populações de células linfoides.....	64
5.5 A inibição terapêutica de PI3Ky reduz a replicação do ZIKA e mitiga danos cerebrais.....	66
5.6 Os neuroblastomas humanos são protegidos pelo tratamento terapêutico com o inibidor AS605240 durante a infecção pelo ZIKV.....	69
<b>6.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>7.CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>8.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>

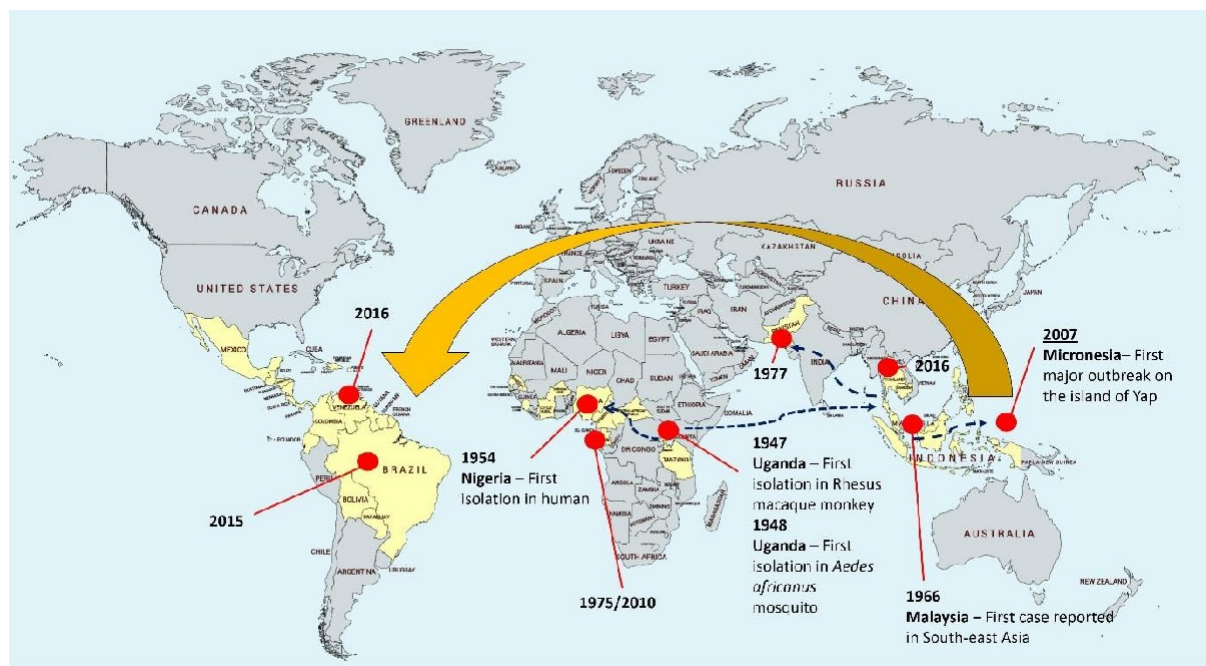
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Breve histórico e contexto atual do Zika

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus emergente transmitido principalmente pelo mosquito do gênero *Aedes*. Recentemente, o ZIKV foi introduzido na América do Sul, causando em alguns casos, infecções com complicações neurológicas graves, oculares, distúrbios no desenvolvimento de bebês nascidos de mães infectadas pelo vírus durante a gestação, e também outras complicações como distúrbios neurológicos em adultos, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) (Musso D et al., 2014).

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em macaco rhesus na floresta Zika, em Uganda, no ano de 1947 (DICK et al., 1952) (Figura 1). O isolamento ocorreu durante o monitoramento de febre amarela que era realizado no local (Gubler DJ et al., 2007). Esse programa de pesquisa foi essencial para a descoberta não só do ZIKV, mas também como para outros arbovírus, como West Nile vírus, vírus Ntaya e vírus Uganda S (Gubler DJ et al., 2007).

Em 1954, foi documentado o primeiro caso de infecção pelo ZIKV em humanos (Figura 1). O vírus foi isolado do soro de uma menina nigeriana de 10 anos, e logo após, mais dois casos de infecções em humanos foram confirmados na Nigéria através de anticorpos neutralizantes em exames sorológicos (Macnamara et al., 1954). Posteriormente, infecções humanas foram identificadas em diferentes países da África e da Ásia. Em 2007, o Estado de Yap relatou o primeiro grande surto de ZIKV, estimando que 73% (intervalo de confiança de  $\pm 95\%$ ) dos residentes de Yap com 3 anos ou mais foram infectados. Apesar do alto número de casos, não houve confirmações de hospitalizações ou mortes relacionadas ao ZIKV (Duffy MR et al., 2009).



**Figura 1. Cenário epidemiológico mundial do ZIKV.** O vírus foi isolado pela primeira vez em Uganda a partir do macaco rhesus e do mosquito *Aedes africanus*, seguido pelo primeiro isolamento em humanos em 1954 na Nigéria. As circulações subsequentes foram restritas à África e ao Sudeste Asiático. Em 2015, ocorreu o surgimento do vírus Zika na América do Sul. Adaptado de Tham Hwet et al., 2018.

Nos anos seguintes, uma nova epidemia foi notificada na Polinésia Francesa, no sul do Pacífico, entre 2013 e 2014, com 28.000 casos detectados (CAO-LORMEAU et al., 2014; Musso D et al, 2014). Durante essa epidemia, foram relatados 42 casos de SGB, uma incidência 20 vezes maior do que o esperado (Musso D et al., 2014).

Em 2014 e 2015, surtos menores ocorreram em outras regiões do Pacífico, contribuindo para a disseminação do vírus nas Américas (PETERSEN et al., 2016). Em 2015, o ZIKV já havia se espalhado pelo Brasil, começando pelos estados de Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte (RN) e Bahia (BA) na região Nordeste, e depois para outras regiões do Centro-Oeste e Sudeste (Lowe, R et al., 2018).

No período entre 2010 e 2014, o número anual de casos de microcefalia variava entre 150 a 200. Durante a epidemia de Zika vírus entre 2015 e 2016, foram notificados 7.623 casos de microcefalia (Pan American Health Organization, 2016). Em resposta a essa situação, no final de 2015, o Ministério da Saúde declarou a infecção pelo ZIKV como uma emergência nacional de saúde pública devido ao aumento significativo no número de recém-nascidos com microcefalia nas maternidades do Nordeste do Brasil (Lowe, R et al., 2018). Logo após, surgiram as

primeiras evidências apoiando essa ligação através da detecção do vírus no líquido amniótico de mulheres grávidas com fetos microcefálicos e no tecido cerebral fetal (Lowe, R et al., 2018). Por fim, em abril de 2016, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA confirmou que a infecção pelo ZIKV está diretamente relacionada com microcefalia e outras anomalias graves do desenvolvimento cerebral (MLAKAR et al., 2016; RASMUSSEN et al., 2016).

Segundo estimativas do Ministério da Saúde, em 2015 ocorreram entre 440 mil e 1,3 milhões de infecções pelo ZIKV no Brasil (Ministério da Saúde, 2015). Em 2016, foram registrados 213.350 casos prováveis de infecção pelo ZIKV no país. Nos anos seguintes, houve uma significativa redução no número de casos, com 17.593 casos prováveis em 2017, 8.219 em 2018, 10.318 em 2019, 8.209 em 2020, 6.207 em 2021 e 8.315 em 2022. Mais recentemente, em 2023, a maioria dos casos foram registrados nas regiões Nordeste (3.391 casos) e Sudeste (2.265 casos), totalizando 7.292 casos prováveis sem nenhum caso de óbito em todas as regiões do Brasil (Ministério da Saúde, 2024).

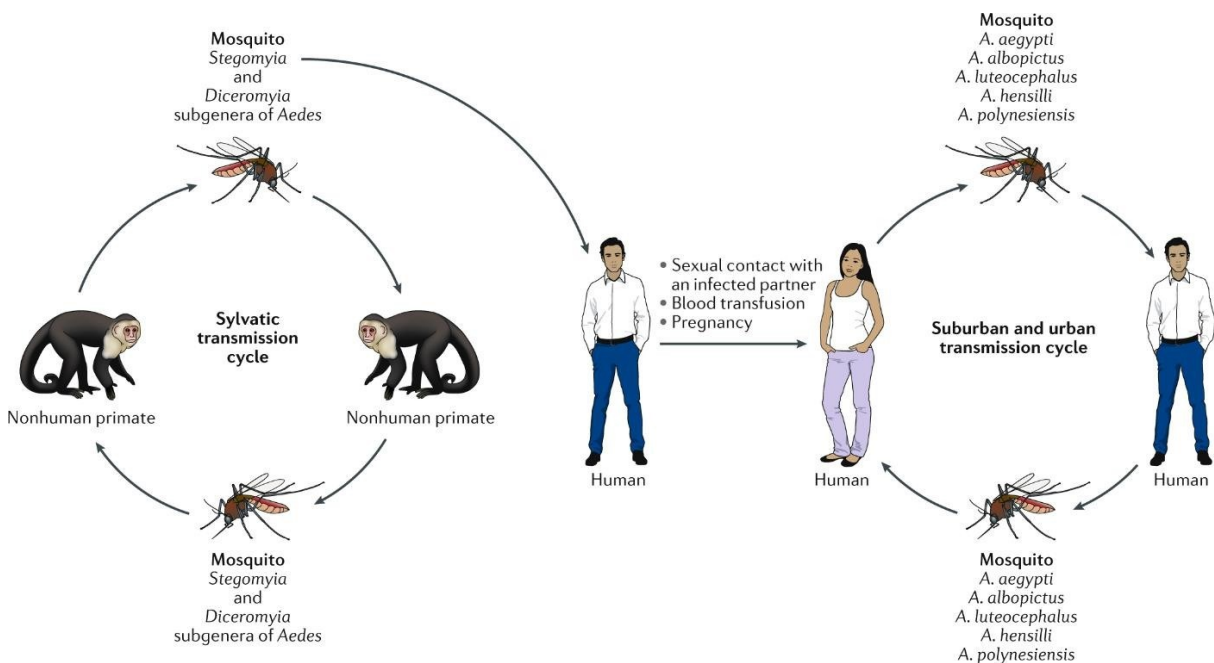
## 1.2 Transmissão do Zika vírus

A transmissão do ZIKV ocorre principalmente por meio da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*, principalmente pelas espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Além de transmitir ZIKV, essas espécies de mosquitos também podem transmitir outros vírus nas Américas e ao redor do mundo, como o vírus da Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e vírus da febre amarela (YFV) (MONAGHAN et al., 2016).

Apesar desses mosquitos do gênero *Aedes* apresentarem susceptibilidade à infecção pelo ZIKV, foi demonstrado que o *A. aegypti* e *A. albopictus* são vetores poucos competentes. Isso sugere que existe outros fatores que contribuem para a rápida disseminação do ZIKV, como uma grande população susceptível ao vírus e a alta quantidade de mosquitos em contato com humanos (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016). Já foi descrito também que os mosquitos *A. hensilli* e *A. polynesiensis* participaram da transmissão do ZIKV nas Ilhas Yap e na Polinésia Francesa (LEDERMANN et al., 2014; RICHARD; PAOAAFAITE; CAO-LORMEAU, 2016). Por

fim, o ZIKV foi identificado em mosquitos *Anopheles coustani*, *Mansonia uniformis* e *Culex quinquefasciatus*, porém estes apresentam menor competência vetorial quando comparados aos mosquitos das espécies *A. aegypt* e *A. albopictus* (DIALLO et al., 2014; GUEDES et al., 2017).

O ciclo de transmissão do vírus Zika é composto por dois principais tipos de ciclos: o ciclo silvestre e o ciclo urbano (Figura 2). No ciclo silvestre, o vírus circula entre primatas não humanos e mosquitos do gênero *Aedes* que vivem em ambientes florestais. Já o ciclo urbano envolve a transmissão do vírus entre humanos e mosquitos, sendo o *Aedes aegypti* o vetor mais comum (KURSCHEIDT et al., 2019). Este ciclo ocorre principalmente em áreas suburbanas e urbanas, onde os mosquitos picam humanos infectados e depois transmitem o vírus para outros humanos (KURSCHEIDT et al., 2019).



**Figura 2: Esquema dos ciclos de transmissão do Zika vírus.** No ciclo silvestre o ZIKV é transmitido entre primatas não humanos e mosquitos *Aedes* (subgêneros *Stegomyia* e *Diceromyia*). No ciclo urbanos e suburbanos, ele é transmitido para humanos principalmente por mosquitos *Aedes aegypti*. Porém a transmissão pode ocorrer por outras vias, como sexual com um parceiro infectado, transfusão sanguínea e durante a gestação. Fonte: Kurscheidt e colaboradores (2019).

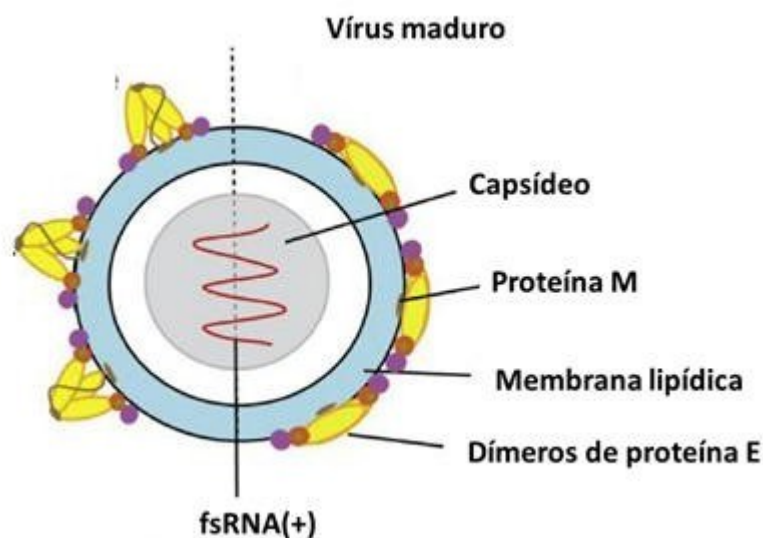
Estudos demonstraram que o ZIKV também pode ser transmitido verticalmente, da mãe para o feto em desenvolvimento durante a gestação, de várias formas, como

por via transplacentária, durante o parto e durante a amamentação. Sabe-se também que o ZIKV pode ser transmitido por meio de transfusões de sangue e transplantes de órgãos, da mesma forma que outros membros do gênero *Flavivirus*, e por meio de contato sexual. Essas hipóteses são corroboradas pelos achados de RNA viral em amostras de soro, urina e leite materno, detectados por qPCR (GREGORY et al., 2017; MUSSO et al., 2015; PETERSEN; BUSCH, 2010).

### 1.3 O ZIKA VIRUS

O ZIKV pertence ao gênero flavivírus e à família *Flaviviridae* (Byler et al., 2016). Além do ZIKV, essa família inclui outros vírus importantes, como o vírus da dengue (DENV), o vírus da febre amarela (YFV- Yellow Fever Virus), o vírus do Oeste do Nilo (WNV – West Nile Virus) e o vírus da Encefalite Japonesa (JEV – Japanese Encephalitis Virus) (CULSHAW; MONGKOLSAPAYA; SCREATON, 2018).

Semelhante aos outros arbovírus da mesma família, o genoma do ZIKV é composto por ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e polaridade positiva [fsRNA(+)], com aproximadamente 10.700 nucleotídeos. Seu genoma possui regiões não traduzidas nas extremidades 3' e 5', que flanqueiam a sequência de uma única poliproteína. Através de proteases virais e da hospedeira, essa poliproteína é clivada para dar origem a todas as proteínas estruturais do vírus (Figura 3), como capsídeo (C), precursora de membrana (prM)/membrana (M) e envelope (E), além das proteínas não estruturais que são as NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 ( Figura 4) (KUNO et al., 2017; MUSSO et al., 2016). As proteínas estruturais estão envolvidas principalmente na montagem de partículas virais, na adsorção e penetração viral.



**Figura 3. Estrutura das partículas do ZIKV.** A partícula madura do ZIKV é composta por três proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C), a proteína associada à membrana (M) e a glicoproteína de envelope (E) disposta em dímeros. O genoma de RNA fita simples de polaridade positiva está localizado no interior do capsídeo. Adaptado de QADIR e colaboradores (2018).

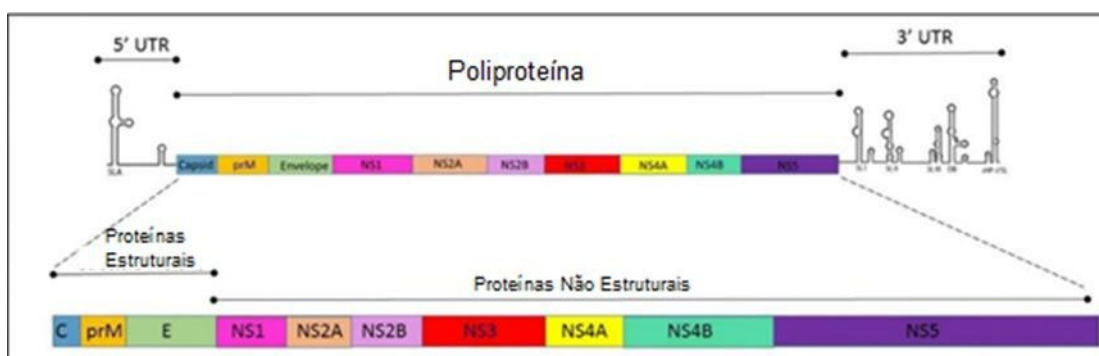
A proteína do capsídeo (C) tem como função facilitar a introdução do genoma viral na célula hospedeira e encapsular o genoma, formando o nucleocapsídeo (NC). A proteína prM/M, encontra-se presente na superfície do envelope das partículas do ZIKV, desempenha um papel crucial na montagem e maturação das partículas virais. Ela interage com a proteína E na membrana do retículo endoplasmático (RE) e encapsula o nucleocapsídeo viral para produzir novas partículas virais imaturas (HU H et al., 2023; GUO M et al., 2021). Após essa etapa, as partículas virais imaturas são transportadas para o aparelho de Golgi, onde a maior parte das proteínas precursoras prM é clivada por furinas da célula hospedeira para produzir a proteína na forma M, com 75 aminoácidos, e um polipeptídeo Pr, com 99 aminoácidos, que está presente em partículas extracelulares após a maturação viral (LINDENBACH et al., 2013).

A proteína E é uma glicoproteína que possui aproximadamente 53 kDa, fundamental para a ligação do vírus aos receptores de superfície celular para a entrada do vírus na célula hospedeira e para fusão da membrana viral com a membrana do endossomo durante o ciclo de multiplicação do ZIKV (LINDENBACH et al., 2013; HU H et al., 2023; GUO M et al., 2021). A proteína E é a principal proteína responsável pelo reconhecimento imunológico e pela indução da produção de

anticorpos neutralizantes contra a infecção pelo vírus (LINDENBACH et al., 2013; Hu H et al., 2023; GUO M et al., 2021).

Estudos realizados por Shan e colaboradores mostraram que o ZIKV sofreu uma mutação na proteína E (V473M) antes de sua transmissão para as Américas em 2013, o que contribuiu para o aumento da neurovirulência, da transmissão materno-fetal e da viremia, facilitando a disseminação urbana (SHAN C et al., 2016). Além disso, foi descrito que a glicoproteína E do ZIKV possui um sítio de glicosilação no resíduo de aminoácido asparagina (Asn154), que tem sido associada aos fatores que favorecem o tropismo do ZIKV para células do sistema nervoso (ANNAMALAI et al., 2017; BARROWS et al., 2018).

As proteínas não estruturais são responsáveis principalmente pela replicação viral, tradução e regulação da resposta imune nas células do hospedeiro (HU H et al., 2023). A proteína NS1 é um glicoproteína que tem como função a evasão da resposta imune do hospedeiro e a modulação da permeabilidade endotelial. Já a NS2A e NS2B atuam no processo de montagem das partículas virais interagindo com a NS3 e NS5 e como co-fator essencial para atividade proteolítica da proteína NS3 respectivamente (ZHANG et al., 2016; ZHANG et al., 2019). A NS3 é uma proteína bifuncional que atua no processamento proteolítico da poliproteína e replicação do genoma viral, visto que, o domínio C-terminal da NS3 possui atividade de RNA helicase, responsável pelo desenrolamento da fita de RNA durante o processo de replicação do genoma (Fig.4) (YANG et al., 2018; LINDENBACH et al., 2013).



**Figura 4. Representação do genoma e da poliproteína do ZIKV.** O genoma do ZIKV é constituído de uma fita simples de RNA com polaridade positiva (sentido 5'- 3') e uma única janela aberta de leitura, que codifica para uma poliproteína precursora, que é clivada em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais. Adaptado Hossein F et al., 2020.

As proteínas NS4A e NS4B desempenham um papel crucial na inibição da resposta imune antiviral induzida pelos interferons (IFN), bloqueando a sinalização desencadeada pelos IFN  $\alpha/\beta$  (LIANG et al., 2016; NGUYEN et al., 2019). A NS5, é considerada a proteína mais conservada entre os flavivírus, ela é fundamental na replicação e amplificação do RNA viral (DUBANKOVA; BOURA, 2019). A região N-terminal da NS5 possui atividade de metiltransferase, que é responsável pela metilação do RNA (capeamento), o que é essencial para aumentar a estabilidade do genoma viral. Já a região C-terminal da NS5 tem atividade de RNA polimerase dependente de RNA (ZHANG et al., 2017).

#### 1.4 Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação do ZIKV começa quando fêmeas hematófagas liberam partículas virais maduras na epiderme ou derme do hospedeiro durante a picada. Após a inoculação, as partículas virais infectam primeiramente células permissivas ao ZIKV, como queratinócitos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e células dendríticas imaturas, além de monócitos que são recrutados para a região da derme (HAMEL et al., 2015). Estudos demonstraram que o ZIKV pode utilizar diferentes receptores celulares para a entrada viral, que variam de acordo com a população celular e o tecido alvo (Tabela 1).

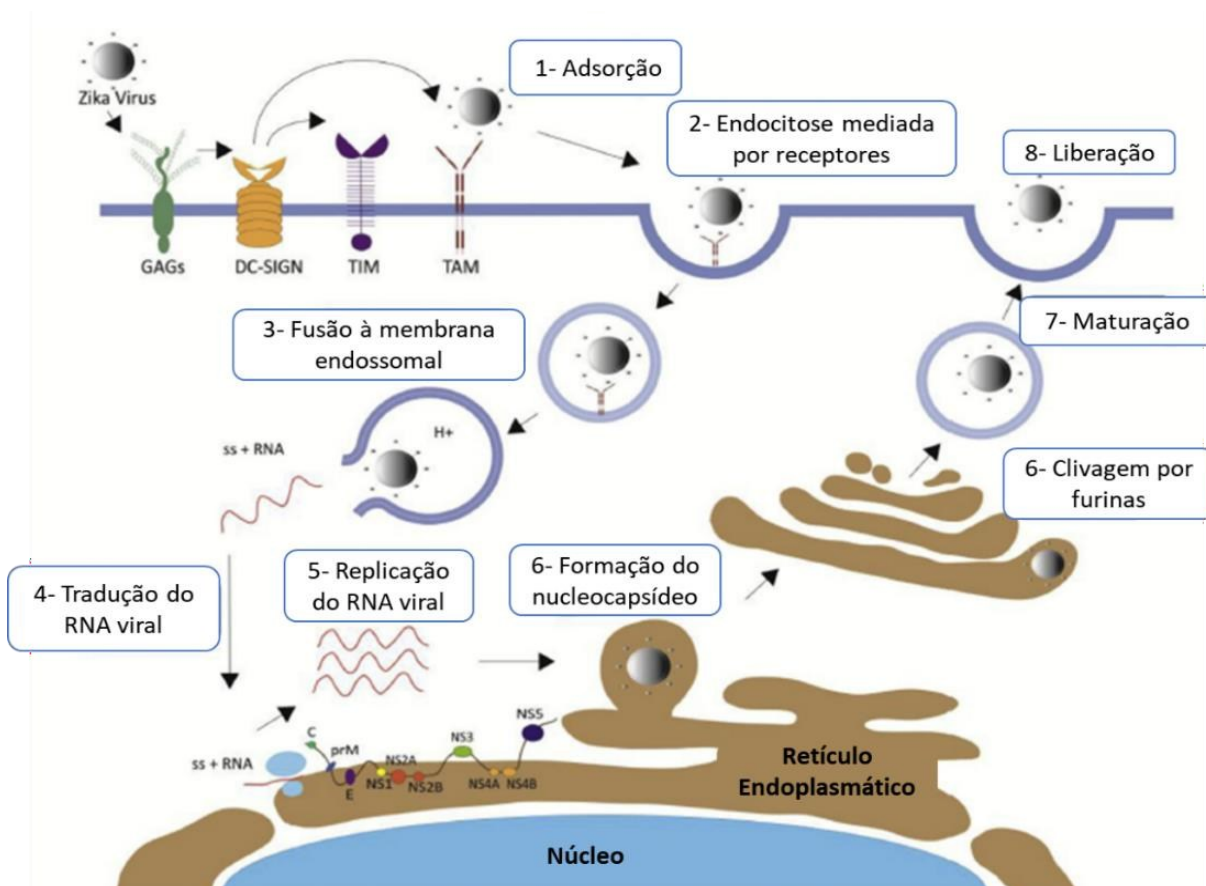
**Tabela 1. Receptores utilizados para entrada do ZIKV**

Órgão/Sistema de Órgãos	Tipo de célula	Receptores
Pele	Fibroblastos dérmicos/queratinócitos	AXL, TIM-1, TYRO3, RIG-I e MDA5
Sistema imunológico	Células dendríticas Monócitos	DC-SIGN CLEC5A
Cérebro	Células progenitoras neurais (NPCs) Células gliais Astrócitos	AXL, ácido siálico ligado a $\alpha 2,3$ da superfície celular AXL
Placenta	Células de Hofbauer Células endoteliais	AXL, Tyro3, TIM-1 AXL, Tyro3, TIM-1
Testículo	Células de Sertoli Espermatozóides	AXL TYRO3

Adaptado de Bhardwaj *et al.* (2021).

Os principais receptores celulares envolvidos nesta etapa são os receptores do tipo tirosina quinase (TAM) tais como AXL e Tyro-3. Receptores do tipo DC-SIGN (do inglês, “dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin”) e TIM-1 (do inglês, “T-cell Immunoglobulin and Mucin domain 1”) (AGRELLI et al., 2019; HAMEL et al., 2015; UTKARSH B et al., 2021).

Na primeira etapa do ciclo de multiplicação, chamada adsorção, ocorre a ligação entre a proteína do envelope viral (E) e os receptores de superfície celular (Figura 5).



**Figura 5. Ciclo de multiplicação do ZIKV.** Na primeira etapa, as partículas de ZIKV se ligam a receptores de superfície celular (adsorção). Esses receptores (receptor de glicosaminoglicanos – GAG, receptor de lectina do tipo C presente na superfície dos macrófagos e células dendríticas - *DC-SIGN*, e receptores de superfície celular do tipo TIM e TAM) promovem a endocitose das partículas que são internalizadas pela célula hospedeira por meio de compartimentos endossomais. No interior do endossomos, o pH ácido promove a fusão da membrana viral com a endossomal e liberação do nucleocapsídeo. O RNA viral é traduzido em uma única poliproteína que é processada por proteases do hospedeiro e pela protease viral. Em seguida, ocorre a replicação o RNA viral e a formação do nucleocapsídeo na membrana no retículo endoplasmático. As partículas virais imaturas são direcionadas para o complexo de Golgi para clivagem da proteína prM em M e maturação das partículas virais. Os vírus maduros são liberados por exocitose e estão aptos para infectar outras células. Adaptado de QADIR et al., 2018.

Após a etapa de adsorção, as partículas virais são internalizadas através da endocitose dependentes de clatrina e são armazenadas no interior de endossomos

(PERSAUD et al., 2018). No interior do endossomos, o pH ácido reorganiza os monômeros da glicoproteína E na forma de dímeros para trímeros, induzindo a fusão da membrana endossomal e membrana viral, ocorrendo então a liberação do nucleocapsídeo e conseqüentemente o RNA do ZIKV para o citoplasma da célula hospedeira (BARROWS et al., 2018; LINDENBACH et al., 2013).

O RNA viral de polaridade positiva liberado no citoplasma será imediatamente traduzido em uma poliproteína por meio de uma única janela de leitura em um processo que ocorre em associação com a membrana do retículo endoplasmático (RE), formando o complexo de replicação viral. As proteínas estruturais e não-estruturais serão produzidas a partir da ação de proteases do hospedeiro e da serino protease viral NS2B-NS3 em sítios de clivagem altamente específicos. A fita de RNA viral, que possui polaridade positiva, é usada na sua replicação para a produção inicial de uma fita de RNA complementar com polaridade negativa. Em seguida, essa fita negativa é usada para a produção de múltiplas cópias de fitas de RNA com polaridade positiva (BARROWS et al., 2018).

Em seguida, no lúmen do RE ocorre o envolvimento do genoma seguido da formação do nucleocapsídeo do vírus, essas partículas imaturas são dirigidas para a face trans do complexo de Golgi por meio de vesículas. Nesta etapa, a proteína prM é crucial para a estabilização conformacional da glicoproteína E, pois impede a fusão da membrana da vesícula em função do pH ácido no interior do Golgi. Além disso, o complexo de Golgi é responsável pela maturação do ZIKV por meio da ação proteolítica de furinas e proteases celulares, promovendo a clivagem da proteína prM em M, promovendo o transporte para a membrana plasmática e liberação das partículas virais maduras por meio de exocitose (LINDENBACH et al., 2013; QADIR et al., 2018). Essas partículas virais, ao serem lançadas para infectar outras células, são responsáveis por dar continuidade ao ciclo infeccioso (QADIR et al., 2018).

### **1.5 Manifestações clínicas e patogênese**

Em 80% dos casos, a infecção pelo ZIKV é assintomática. Porém, casos sintomáticos existem, sendo que as principais manifestações clínicas se iniciam aproximadamente entre 6 à 8 dias após exposição ao vetor infectado e são inespecíficas e ocorrem após o estabelecimento da viremia (FOURIE et al., 2018). Estas são caracterizadas pela ocorrência de febre leve, erupções cutâneas vermelhas por todo corpo, mialgia, artralgia, conjuntivite, alterações na função gastrointestinal e

dores de cabeça (BASARAB et al., 2016; RUTVISUTTINUNT et al., 2015). Esses sintomas, podem ser confundidos com outras arboviroses a exemplo da Dengue e Chikungunya (MUSSO D et al., 2015).

Além disso, devido à alta semelhança entre o ZIKV e o DENV, foi demonstrada em modelos *in vitro* e *in vivo* uma reatividade cruzada entre esses arbovírus. Esse fenômeno é conhecido como “aumento da infecção dependente de anticorpos” (ADE, antibody-dependent enhancement). Sugere-se que o ADE pode contribuir para o agravamento da síndrome congênita do ZIKV em camundongos imunocompetentes (CAMARGOS et al., 2019). Estudos *in vitro* demonstraram que o ADE pode levar a cargas virais mais elevadas do vírus da dengue (KHANDIA et al., 2018; DEJNIRATTISAI et al., 2016; DEJNIRATTISAI et al., 2015).

A hipótese é que, nas infecções secundárias por um sorotipo heterólogo, anticorpos produzidos durante uma infecção primária podem não ser efetivos e, ao contrário, contribuir para o aumento da carga viral. Nessa hipótese, anticorpos gerados na infecção primária atuam como anticorpos não-neutralizantes em uma segunda infecção, seja pelo ZIKV ou outro vírus de alta similaridade. Esses anticorpos não-neutralizantes formam complexos com o ZIKV, facilitam a entrada do vírus nas células e induzem a secreção de citocinas, aumentando a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, a viremia e a disseminação das partículas virais (NGONO; SHRESTHA, 2018).

Além disso, devido à alta semelhança entre o ZIKV e o DENV, foi demonstrado em modelos *in vitro* e *in vivo* uma reatividade cruzada entre esses arbovírus (SARIOL et al., 2018). Essa manifestação é um efeito denominado “aumento da infecção dependente de anticorpos” (ADE, antibody-dependent enhancement). Sugere-se que o ADE pode contribuir para o agravamento da síndrome congênita do ZIKV em camundongos imunocompetentes (CAMARGOS et al., 2019). Estudos *in vitro*, demonstraram que o ADE pode conduzir a cargas mais elevadas do vírus da dengue (KHANDIA et al., 2018; DEJNIRATTISAI et al., 2016; DEJNIRATTISAI et al., 2015).

A hipótese é que nas infecções secundárias por um sorotipo heterólogo, sugerem-se que anticorpos que foram produzidos na infecção primária não serão efetivos e desempenharão o papel inverso, contribuindo para o aumento da carga viral. Nessa hipótese, esse efeito ocorre quando anticorpos gerados na infecção primária tem ação de anticorpos não-neutralizantes em uma segunda infecção, seja o

ZIKV ou outro vírus de alta similaridade. Sugerem-se que esses anticorpos não-neutralizantes formam complexos com o ZIKV, facilitam a entrada do vírus nas células e induzem a secreção de citocinas, aumentando a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, a viremia e a disseminação das partículas virais (NGONO; SHRESTA, 2018). No entanto, não foram detectados casos de aumento da infecção dependente de anticorpos (ADE) do ZIKV associado à imunidade prévia à dengue em primatas não humanos nem em humanos previamente expostos à dengue. Portanto, a ocorrência de ADE ainda precisa ser avaliada e compreendida melhor no contexto dos resultados clínicos (SARIOL et al., 2018).

As formas graves da doença causada pelo ZIKV estão associadas a complicações neurológicas significativas, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) em adultos e a microcefalia em neonatos. A SGB é uma condição rara, caracterizada por uma resposta imunológica inadequada ou exacerbada, que leva a uma resposta autoimune contra os componentes do sistema nervoso periférico. Esse processo resulta em danos às bainhas de mielina e aos axônios dos neurônios, causando perda de tônus muscular e podendo desencadear complicações generalizadas e até mesmo fatais (ELLUL; SOARES; SOLOMON, 2016). Essa condição pode ocorrer em infecções onde há semelhança entre os antígenos do patógeno e os antígenos do sistema nervoso do hospedeiro (WILLISON; JACOBS; VAN DOORN, 2016). A primeira associação da SGB com a infecção pelo ZIKV ocorreu durante um surto na Polinésia Francesa em 2013, onde 42 pacientes foram diagnosticados com a SGB e todos apresentaram anticorpos neutralizantes anti-ZIKV sendo que 98% desses pacientes apresentaram IgM ou IgG anti-vírus Zika (CAO-LORMEAU et al., 2016).

A microcefalia é uma outra grave complicação neurológica associada ao vírus Zika (ZIKV). Durante as epidemias na Polinésia Francesa em 2013 e no Brasil em 2015, essa anomalia cerebral afetou fetos de mães infectadas até o final do terceiro trimestre de gestação. Ela é caracterizada por um distúrbio no desenvolvimento neurológico, onde o cérebro do feto não se desenvolve normalmente, contribuindo para que o crânio também não se expanda e também para o fechamento das suturas cranianas prematuramente, resultando em uma redução do perímetro cefálico do crânio do recém-nascido, podendo em alguns casos, levar à morte (COULOMBIER et al., 2015; CHIMELLI et al., 2017). Além disso, como conseqüências dessa redução,

incapacidades motoras e/ou intelectuais acometem o paciente (CAUCHEMEZ et al., 2016).

Posteriormente outros tipos de anomalias foram observados em crianças nascidas de mães infectadas e denominadas como Síndrome Congênita do Zika (SCZ) (DE OLIVEIRA MELO et al., 2016). As anomalias mais comuns abrangidas na SCZ são as deficiências cognitivas, sensoriais e motoras e as mais incomuns incluem artrogripose, contratura muscular, distúrbios auditivos e oftalmológicos, disfagia e dificuldades de aprendizagem (MIRANDA FILHO et al., 2016; CHIMELLI et al., 2017). Já foi demonstrado que o ZIKV é capaz de se disseminar para diferentes órgãos através da circulação sanguínea/linfática, como na placenta, testículo, útero, olho entre outros (MINER; DIAMOND, 2017). Porém sabe-se que ele apresenta um tropismo principalmente para o SNC, especialmente por células progenitoras neurais, micróglia e astrócitos, causando a morte celular, neuroinflamação e consequentemente neurodegeneração (QUINCOZES-SANTOS et al., 2023). Esse neurotropismo do ZIKV pode ser atribuído à expressão do receptor de proteína tirosina-quinase AXL expressos nessas células. O AXL permite a entrada do ZIKV ao se ligar à partícula viral através da proteína Gas6, posteriormente ele também é responsável por inibir a sinalização de IFN tipo I, é essencial para bloquear a resposta antiviral do hospedeiro desencadeada pelo do ZIKV (MEERTENS et al., 2017).

Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que camundongos deficientes para o receptor de interferon do tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ R<sup>-/-</sup>) são mais suscetíveis à infecção pelo Zika vírus (ZIKV) (COSTA; DEL SARTO et al., 2017). Sabe-se que, nesses camundongos, o ZIKV infecta e ativa células endoteliais, atingindo o sistema nervoso central (SNC) por meio de processos como liberação basolateral, transcitose ou transinfecção (PAPA M et al., 2017). A infecção pelo ZIKV em camundongos IFN- $\alpha/\beta$ R<sup>-/-</sup> aumenta a resposta inflamatória tanto de forma sistêmica quanto no tecido cerebral. Foi observado um aumento no recrutamento de leucócitos e nos níveis de mediadores inflamatórios, como as quimiocinas CCL5 e CXCL1, e as citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , nos cérebros desses camundongos (COSTA; DEL SARTO et al., 2017). Esses achados também foram relatados em humanos infectados pelo ZIKV, onde o soro dos pacientes apresentou níveis elevados de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, CCL3, CCL5, CXCL10 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) durante as fases aguda e convalescente da infecção (TAPPE et al., 2016). A inflamação

induzida pelo ZIKV contribui para uma maior carga viral, microgliose e neurodegeneração nos cérebros dos camundongos  $IFN-\alpha/\beta R^{-/-}$  (COSTA; DEL SARTO et al., 2017).

Além de bloquear a via de IFN-I do hospedeiro, o vírus desencadeia diversas alterações em vias de sinalização para se beneficiar, como a estimulação da via PI3K/AKT para promover a sobrevivência celular e garantir sua própria replicação viral (LEE, CHYAN-JANG et al., 2005). Devido a isso, existem diferentes terapias que têm como alvo as vias de sinalização da célula hospedeira ou enzimas envolvidas no ciclo de replicação viral (CHAN; Jasper Fuk-Woo et al., 2018). Por exemplo, as cinases das células hospedeiras estão cada vez mais ligadas à patogênese de infecções virais, uma vez que os vírus podem utilizá-las para facilitar sua replicação (Chu e Yang, 2007; Linero e Sclaro, 2009).

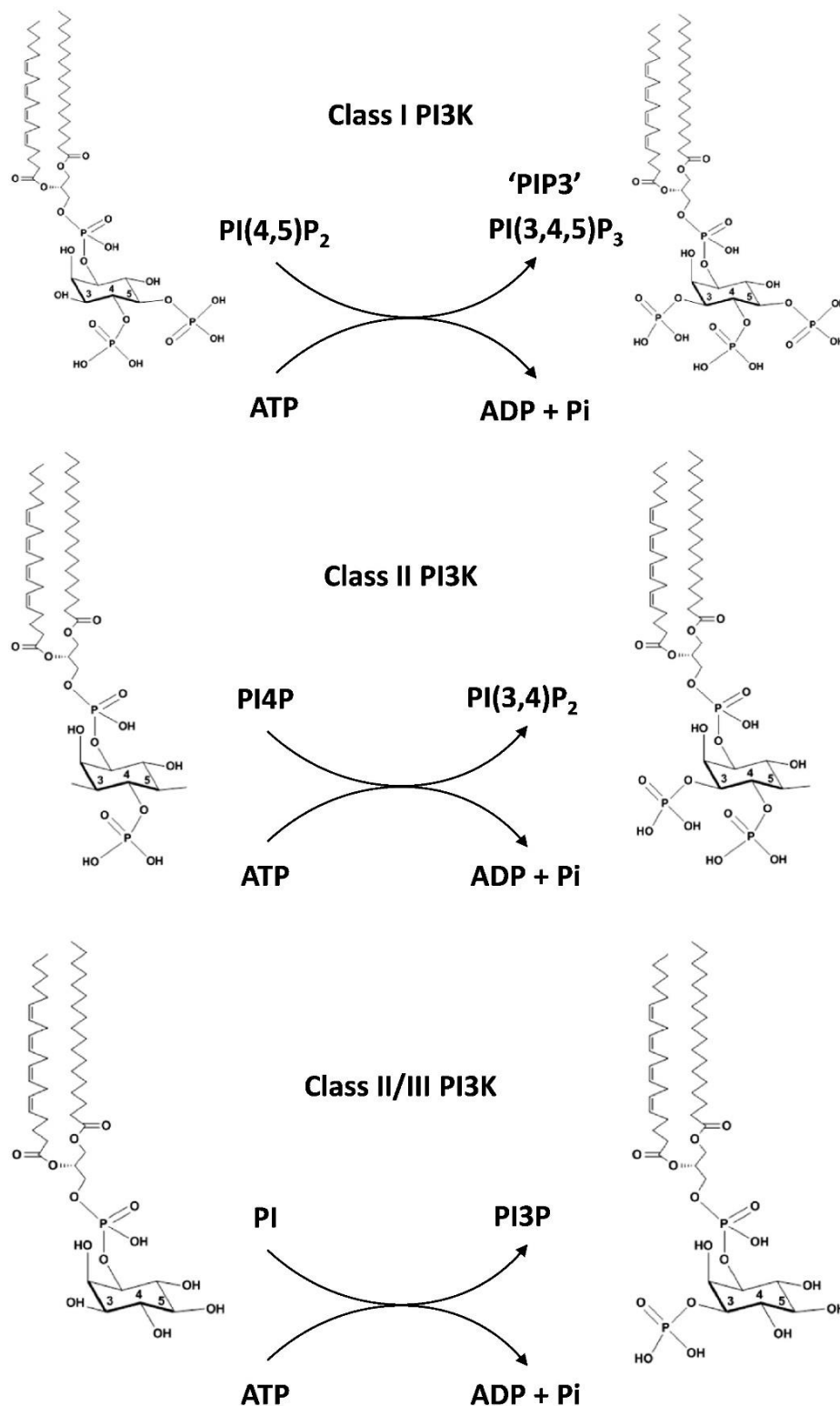
### **1.6 Fosfatidilinositol 3-quinase $\gamma$**

O fosfatidilinositol é um componente abundante na membrana celular de eucariotos. Diferentemente de outros fosfolípidos, o fosfatidilinositol contém cinco hidroxilas livres com potencial para fosforilação em seu grupo Inositol. Diversos tipos de derivados de fosfatidilinositol (PtdIns) são formados na célula, cada um desempenhando funções específicas. Apesar de não ser o fosfolípido mais abundante, ele desempenha um papel crucial na transdução de sinais e serve como precursor para várias moléculas mensageiras secundárias (FRUMAN et al., 1998).

As fosfatidilinositol 3-quinases (PI3Ks) constituem uma família de enzimas que são responsáveis por catalisar a fosforilação de moléculas de fosfatidilinositol. Existem três classes de PI3Ks e que são divididas de acordo com sua estrutura, função e especificidade do substrato (FRUMAN et al., 1998). A Classe I da PI3K é composta por quatro isoformas ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ), Classe II por três isoformas ( $C2\alpha, C2\beta, C2\gamma$ ) e a classe III por um único membro a proteína vacuolar 34 (Vps34) (Aytenfisu TY et al., 2022; Backer J et al., 2008).

As isoformas  $\alpha, \beta, \gamma$  e  $\delta$  da Classe I, catalisam a fosforilação do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) na posição 3 do anel de inositol para gerar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>; Fig. 6). PIP<sub>3</sub> é um lipídio sinalizador utilizado como segundo mensageiro por diferentes receptores de superfície celular para controlar o movimento, crescimento, proliferação, diferenciação, motilidade e sobrevivência. As

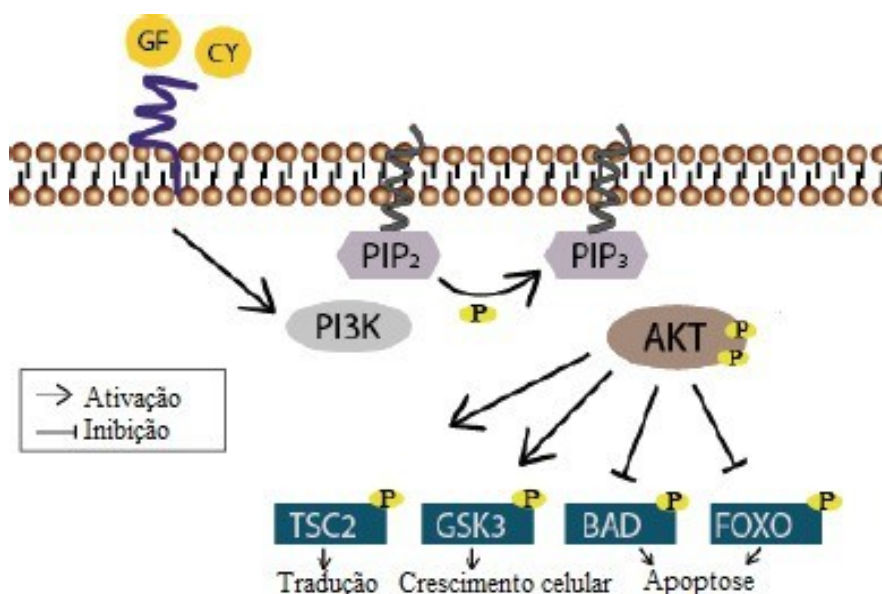
funções dessas quatro isoformas se sobrepõem, porém, cada uma é adaptada para receber eficientemente estímulos de subtipos específicos de receptores. Na classe II as isoformas funções ainda são pouco compreendidas pois existem limitações como a falta de inibidores seletivos (Falasca et al. 2017). Mas, o pouco sabido é que a classe II pode estar envolvida na síntese de fosfolipídios de membrana e na regulação da endocitose (Posor et al., 2013; HAWKIN& STEPHENS, 2015). E a Classe III da PI3K, sintetiza o fosfolipídio PI em PI3P, que regula o tráfico de endossomos e lisossomos e a indução de autofagia, vias envolvidas na morte dos patógenos, processamento do antígeno e sobrevivência das células imunes. (HAWKINS & STEPHENS, 2015; Backer J et al., 2008).



**Figura 6. Reações catalisadas por PI3Ks.** PI3Ks transferem o  $\gamma$ -fosfato de ATP para a posição 3 no anel inositol. PI3Ks de classe I fosforilam seletivamente PI em PIP3. PI3Ks de classe II fosforilam PI e PI4P. A classe III é específico para fosforilação de PI em PI3P. Adaptado de HAWKINS & STEPHENS, 2015.

No geral, as PI3Ks de classe I são heterodímeros formados por uma subunidade catalítica p110 (com isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ ) e uma subunidade reguladora (principalmente p85, mas também p50, p55, p101 e p84). A classe I é subdividida em classe IA (p110  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\delta$ ) e classe IB (p110 $\gamma$ ), com base na sequência da subunidade p110, no domínio regulador utilizado e no substrato preferido (Posor et al., 2013).

As PI3Ks de classe I são reguladas direta ou indiretamente por receptores de superfície celular (Posor et al., 2013; Aytenfisu TY et al., 2022). Após a ativação dos receptores tirosina quinase (RTKs) e dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), os principais efetores a jusante são os componentes da classe I, esses são responsáveis por converter os sinais de vários fatores de crescimento e citocinas em mensagens intracelulares por meio de fosfolipídios geradores, que resultam na ativação da proteína quinase serina-treonina AKT (também conhecida como proteína quinase B (PKB) e de outras vias efetoras downstream (CANTLEY & NEEL et al., 1999). Após a ativação da AKT, ocorre a fosforilação de uma série de resíduos Ser/Thr em proteínas de sinalização celular, desencadeando sinais responsáveis por regular o crescimento celular, a entrada no ciclo celular e a sobrevivência celular (Figura 7). Diversas proteínas pró-apoptóticas foram identificadas como alvos da fosforilação pela AKT, incluindo BAD, um membro da família Bcl-2, e caspase-9. A fosforilação dessas proteínas pela AKT resulta em sua inativação e conseqüentemente, em um estímulo pro-sobrevivência para a célula. Dessa forma, ao inativar BAD a AKT pode adiar a apoptose (COORAY, 2004).



**Figura 7. Esquema da via de sinalização PI3K/AKT.** O fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é ativado

por meio do receptor de ligação (receptores tirosina quinases (RTKs) ou pelos receptores acoplados com a proteína G (GPCR), linha azul) pelos fatores de crescimento (GF) ou citocinas (CY) resultando em fosforilação de PIP2 em PIP3 subsequentemente serve como segundo mensageiro permitindo a ligação de proteínas parecidas com AKT contendo domínios homólogos a plecstrina. Este último passa por mudanças conformacionais levando a sua fosforilação e ativação da AKT. A AKT finalmente participa na regulação de processos celulares como tradução, crescimento celular e apoptose por meio da fosforilação de outras proteínas. Fonte: Modificado de DIEHLI & SCHAAL, 2013.

Como visto, a atividade basal da via da PI3K/Akt garante a sobrevivência celular e executa um papel regulador crítico que gera em muitos processos celulares, como o processamento de RNA, tradução, autofagia e apoptose. Devido a isso, muitos vírus de diferentes gêneros para assegurar sua multiplicação, estimulam a atividade dessa via para garantir a sobrevivência celular, prevenindo ou adiando a apoptose (DIEHLI & SCHAAL et al., 2013).

Foi demonstrado que durante a infecção pelo vírus influenza A, o vírus ativa a PI3K/AKT em diferentes estágios da multiplicação viral. Inicialmente, a ativação dessa via ocorreu para a o vírus ter uma a adsorção mais eficiente. Nos estágios mais tardios, PI3K parece suprimir a apoptose induzida pela infecção viral e parece também possuir funções antivirais (EHRHARDT & LUDWIG, 2009).

Foi demonstrado que, durante a infecção pelo vírus influenza A, o vírus ativa a via PI3K/AKT em diferentes estágios da multiplicação viral. Inicialmente, essa ativação ocorre para aumentar a eficiência da adsorção viral. Nos estágios mais tardios, a PI3K

parece suprimir a apoptose prematura e também possui funções antivirais (EHRHARDT & LUDWIG, 2009).

Neste mesmo contexto, estudos importantes evidenciam o papel da via da PI3K/Akt na patogênese do DENV e da encefalite japonesa (JEV). Nesses estudos, o DENV e o JEV, ativam a via PI3K/Akt em diversos tipos celulares, incluindo células neuronais (N18), epiteliais (A549) e fibroblastos (BHK-21), para inibir a apoptose celular e aumentar a replicação viral (LEE, CHYAN-JANG et al., 2005). Em outro estudo, foi demonstrado que o RNA subgenômico (sgRNA) do DENV-2, gerado após a infecção, é determinante para induzir o aumento da apoptose por meio da ativação da via PI3K/Akt através de um mecanismo relacionado com Bcl-2 (LIU et al., 2014).

Durante a infecção pelo ZIKV, descobriu-se que a AKT fosforila as proteínas NS5 do vírus e afeta diferencialmente a atividade da RNA polimerase, contribuindo para a replicação viral (Albentosa-González L et al., 2021). Além disso, foi demonstrado que o ZIKV é inibido através da regulação negativa da via PI3K/Akt ao usar o inibidor AR-12 em células neuronais e em camundongos A129 infectados pelo ZIKV (LEE, CHYAN-JANG et al., 2005).

Dentro do grupo da classe I da PI3K, a fosfatidilinositol 3-quinase  $\gamma$  (PI3K $\gamma$ ) é composta pela subunidade catalítica p110 $\gamma$  e pelas subunidades regulatórias p101 ou p84. PI3K $\gamma$  é expressa constitutivamente em diversos tipos celulares, incluindo leucócitos, células endoteliais, células da glia e neuronais (HAWKINS & STEPHENS et al., 2015). Esta enzima tem recebido bastante atenção em doenças inflamatórias devido às suas múltiplas funções nas diferentes populações de leucócitos (COSTA C, 2011; RUCKLE et al., 2006). Por isso, o desenvolvimento de inibidores de p110 $\gamma$  para o tratamento dessas doenças tem sido investigado (RÜCKLE et al., 2006; FRUMAN et al., 2017).

Além disso, em estudos in vivo camundongos deficientes para a PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma$ -/-) têm sido usados o papel da PI3K $\gamma$  e demonstrar suas diversas funções biológicas como recrutamento de monócitos e macrófagos para o ambiente inflamatório, desenvolvimento de timócitos, ativação de linfócitos T e degranulação de mastócitos (SMIRNOVA et al., 2014).

Foi observado que camundongos que possuem deficiência na subunidade catalítica p110 da PI3K $\gamma$  apresentam sérios defeitos na migração de neutrófilos. Especificamente, há uma redução na capacidade de quimiotaxia dessas células devido a problemas no rolamento dos neutrófilos, não afetando o processo de adesão

(Sasaki et al., 2000). Pinho e colaboradores (2007) mostraram que o papel da PI3K $\gamma$  no recrutamento de neutrófilos varia de acordo com o estímulo inflamatório específico e o tecido envolvido. Estudos adicionais indicaram que a ausência de PI3K $\gamma$  prejudica a migração de macrófagos induzida por citocinas tanto em configurações de cultura celular quanto em modelos in vivo.

Foi evidenciado que a PI3K $\gamma$  desempenha um papel importante na ativação e diferenciação dos linfócitos. As isoformas PI3K $\delta$  e PI3K $\gamma$  são fundamentais para as células T, é necessário uma regulação precisa da via PI3K para manter o equilíbrio entre a tolerância imunológica e a inflamação (Ladygina et al., 2013). A desregulação dessa via está associada a doenças autoimunes e inflamatórias mediadas por células T (Ghigo et al., 2010; Way et al., 2016). De acordo com isso, pesquisas têm mostrado resultados promissores ao modular a via da PI3K para controlar o conjunto de células T auxiliares para tratar doenças autoimunes, inflamatórias e câncer. No entanto, ainda é necessário aprofundar o entendimento sobre a função específica das diferentes isoformas de PI3K em subconjuntos de células imunes patogênicas e protetoras, em diferentes patologias (Cameron B et al., 2022).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A patogênese do ZIKV envolve uma interação complexa entre fatores do hospedeiro e do vírus. Desde a epidemia ocorrida em 2015/2016 a infecção pelo ZIKV tem se configurado como uma ameaça à saúde pública, devido à sua associação à complicações neurológicas em crianças nascidas de mães infectadas durante a gestação que, no pior cenário possível, incluem a microcefalia. Este impacto no sistema nervoso está pelo menos em parte associado a resposta imune do hospedeiro frente a infecção, fenômeno conhecido como neuroinflamação. Desse modo, avaliar o papel da via da fosfatidilinositol 3-quinase  $\gamma$ , uma molécula ubiquamente expressa em diferentes tipos celulares, incluindo leucócitos, neurônios e células da glia, frente à infecção pelo ZIKV é de extrema importância, pois pode auxiliar a identificação de potenciais alvos terapêuticos no tratamento dos acometimentos neurológicos associados à síndrome congênita do zika (SCZ).

### 3.OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da via da fosfatidilinositol 3-quinase  $\gamma$  (PI3Ky) na patogênese da infecção pelo ZIKV.

#### 3.2 Objetivos específicos

I – Determinar os efeitos da ativação da via da PI3Ky na replicação do ZIKV em cultivos de neurónios primários de animais deficientes para a subunidade catalítica (PI3K<sup>kd/kd</sup>), bem como na morte neuronal induzida pela infecção.

III- Investigar o efeito do bloqueio farmacológico da PI3Ky em camundongos deficientes para o receptor de Interferon do tipo I (A129) infectados pelo ZIKV. Para isso serão analisados:

- a) Avaliação dos parâmetros clínicos após a infecção pelo ZIKV.
- b) Avaliação de lesão tecidual no cérebro.
- c) Avaliação de células positivas para iba-1 e S100b no cérebro.
- d) Avaliação da produção de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, quimiciocinas e fator neurotrófico no cérebro dos animais

IV- Investigar o perfil celular no cérebro dos camundongos infectados pelo ZIKV tratados com inibidor farmacológico da PI3Ky.

- a) Avaliação de células mieloides e a produção de mediadores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios liberadas por elas no cérebro de camundongos.
- b) Avaliação de células linfoides e a produção de mediadores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios liberadas por elas no cérebro de camundongos.

V- Investigar o efeito terapêutico do bloqueio farmacológico da PI3Ky em camundongos deficientes para o receptor de Interferon do tipo I (A129) infectados pelo ZIKV. Para isso os mesmos parâmetros avaliados em III serão realizados.

VII- Investigar se o ZIKV modula a via da PI3Ky em Cultura de Neuroblastoma Humano (SH-SY5Y).

a) Avaliação da fosforilação da AKT em diferentes tempos após infecção.

VII- Investigar o efeito do bloqueio farmacológico da PI3Ky em Cultura de Neuroblastoma Humano (SH-SY5Y) infectado pelo ZIKV;

a) Avaliação do inibidor da PI3Ky na fosforilação da AKT

b) Avaliação da viabilidade e morte celular.

c) Avaliação do título viral no sobrenadante celular.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Camundongos da linhagem A129 deficientes para o gene que codifica o receptor dos Interferons do Tipo-I e os camundongos geneticamente modificados para a atividade catalítica da enzima (PI3Kykd/kd) foram obtidos do Biotério de matrizes de São Paulo (USP). Camundongos da linhagem C57BL/6 foram adquiridos no Centro de Bioterismo da UFMG. Todos animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, sob condições controladas de temperatura (28°C a 30°C), umidade (50%), ventilação, ciclos de iluminação de 12 horas e ração e água sem restrições. Ambos machos e fêmeas adultos foram utilizados no presente estudo, possuindo entre 6 a 8 semanas de idade. Este estudo, tal como todos os procedimentos experimentais foram previamente submetidos ao comitê de ética em experimentação animal (CEUA) da UFMG. Protocolo: 72/2020.

### 4.2. Vírus

O vírus utilizado nesse estudo foi o isolado clínico do ZIKV (ZIKV HS 2015 BA1; disponível em [ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX520666](https://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX520666)), obtido a partir do soro de um paciente infectado em Salvador-BA em 2015. O ZIKV foi propagado em células de mosquito *Aedes albopictus* C6/36 (BCRJ 0343) como descrito anteriormente (Costa et al 2017). Os estoques virais foram produzidos em células VERO-CCL81 (BCRJ 0245),

mantidas em estufa com atmosfera umidificada a 37°C na presença de CO<sub>2</sub>, em meio de cultivo RPMI (1x) suplementado com 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 10% Soro Fetal Bovino, durante 3-5 dias. Após a propagação, todo o sobrenadante foi coletado e concentrados (Centricon Millipore) e armazenados em freezer -80°C previamente ao uso.

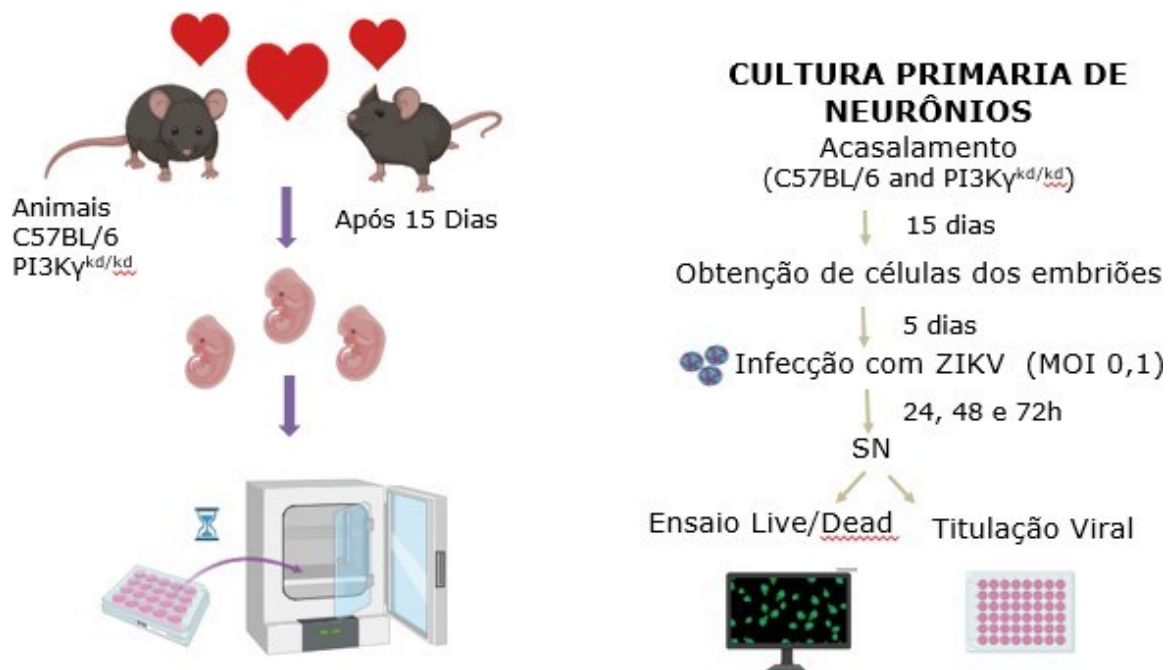
### 4.3 Tratamento

Para investigar o papel do PI3K $\gamma$  na infecção pelo ZIKV, utilizamos o inibidor seletivo AS605240 (Sigma Aldrich). No modelo in vivo, camundongos A129 foram tratados diariamente com uma dose subcutânea de 30 mg/kg do inibidor AS605240, dissolvido em solução salina (Cloreto de Sódio 0,9%) com 3% de DMSO, com base em dados previamente descritos na literatura (Camps et al., 2005).

### 4.4 Cultura de neurônios primários e ensaio de morte celular (Live/Dead).

Inicialmente, o ciclo estral das fêmeas foi avaliado por citologia vaginal, conforme descrito por Byers e colaboradores (2012), para determinar o período fértil (ovulatório) das fêmeas e, assim, determinar a data exata da fecundação durante os acasalamentos. Para a obtenção dos embriões com 15 dias (D15) de gestação, casais de camundongos C57BL/6 e PI3K $\gamma$ kd/kd (proporção de um macho para cada fêmea nas fases proestro ou estro do ciclo estral) foram acondicionados em uma mesma caixa pelo período de 24 horas. Após, foram realizadas a verificação da presença do plug vaginal, que é um sinal de cópula, e foi avaliado o ciclo estral, a fim de se obter um indicativo de fecundação anterior à inoculação nesses animais. As fêmeas consideradas grávidas foram separadas em outra caixa e o período gestacional anotado. As culturas neuronais foram feitas a partir do córtex e das regiões estriatais dos cérebros de embriões das linhagens C57BL/6 e PI3K $\gamma$ <sup>kd/kd</sup>, no dia 15 (D15) de gestação. No ensaio para obtenção de células neuronais, foi realizado um procedimento de dissecação do tecido cerebral, que foi submetido a tripsina, seguido de dissociação celular utilizando uma pipeta de Pasteur polida pelo fogo. O tratamento das placas com poly-L-ornithine foi realizado durante 1 hora, 24 horas antes do plaqueamento das células neuronais, que foi feito em meio neurobasal suplementado com B27, N2, GlutaMAX 2mM, penicilina 50  $\mu$ g/ml e estreptomicina 50  $\mu$ g/ml. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em uma incubadora umidificada e

cultivadas por 5 dias *in vitro*. Após isso, foi realizada a infecção das células neuronais com ZIKV (MOI 0,1) durante 1 hora de adsorção. O resíduo de vírus foi retirado da placa e lavado duas vezes com meio neurobasal incompleto. Depois disso, foi adicionado um novo meio suplementado conforme descrito anteriormente. As células foram incubadas novamente em uma estufa úmida de CO<sub>2</sub>. Em diferentes tempos de infecção, o sobrenadante celular foi coletado para análises posteriores, como titulação viral e ELISA. Além disso, com as células aderidas na placa, foi realizado o ensaio de morte celular descrito como *LIVE/DEAD* (FIGURA 8).



**Figura 8. Esquema representativo para avaliar o papel da via PI3Ky durante a infecção pelo ZIKV em cultura de neurônios primários.** A cultura primária de neurônios foi realizada a partir de embriões de camundongos WT; deficiente para a subunidade catalítica da enzima (PI3Ky<sup>kd/kd</sup>). Após 24, 48 e 72 horas da infecção pelo ZIKV, o sobrenadante foi coletado para titulação viral e as células aderidas foram submetidas ao ensaio de morte celular (*LIVE/DEAD*).

No ensaio de morte celular (*LIVE/DEAD*) os neurônios foram corados com 2  $\mu$ M éster acetoximetílico de calceína (AM) e 2  $\mu$ M de homodímero de etídio 1, tempo de incubação 15 minutos, foi determinado que a frações de células vivas (calceína AM positiva) e mortas (células positivas para o homodímero de etídio 1). As células neuronais foram visualizadas e fotografadas em um microscópio de fluorescência, a Estação de Imagem Celular FLoid® (Thermo Scientific). Foi realizado a análise de triplicatas experimentais e biológicas no software ImageJ. Células mortas foram

expressas como uma porcentagem do número total de células, como descritas em (COSTA & DEL SARTO et al., 2017).

#### 4.5 Experimentação animal, parâmetros clínicos, eutanásia e coleta das amostras

Para avaliar se o ZIKV modula a via da PI3Kγ em cérebros de camundongos, realizamos um estudo cinético para analisar a fosforilação da AKT em diferentes momentos de infecção. Para isso, camundongos A129 foram infectados com ZIKV ( $4 \times 10^3$  PFU/200  $\mu$ l) por via intravenosa. Os animais foram eutanasiados sobredose de anestésico (cetamina 80 mg/kg e xilazina 15 mg/kg) em seguida de deslocamento cervical em diferentes tempos: 6 horas, 1 dia, 3 dias e 5 dias após a infecção para coletar o cérebro para análises posteriores de western blot (FIGURA 9).

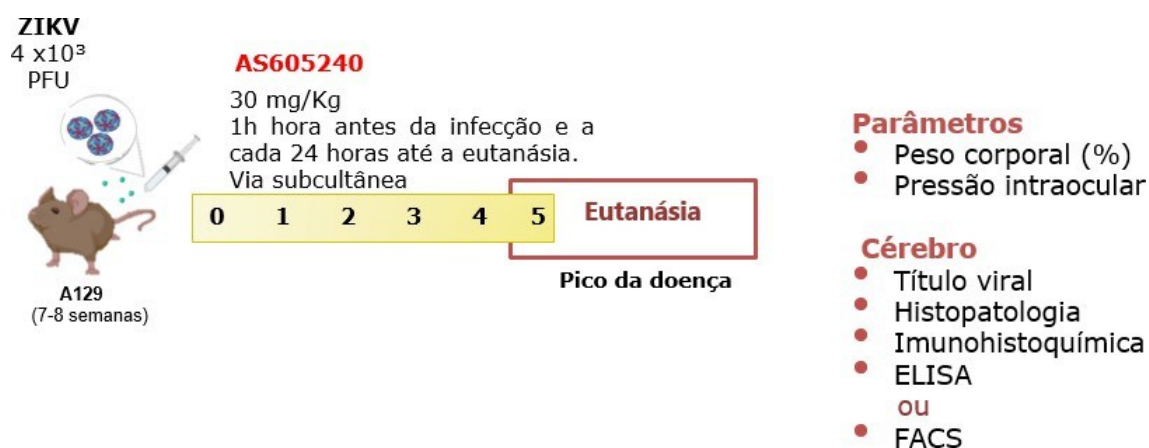


**Figura 9: Esquema representativo para avaliar a fosforilação da AKT em diferentes tempos de infecção pelo ZIKV.** Animais fêmeas e machos de 6-8 semanas foram infectados por via intravenosa com inóculo de  $4 \times 10^3$  PFU/200 $\mu$ l na hora zero. 6 horas, 1 hora, 3 horas e 5 horas após a infecção foi realizada a eutanásia dos animais e a coleta do cérebro para análises posteriores.

Para estudar o papel da via da PI3Kγ foi realizado o bloqueio farmacológico da via através do uso do inibidor AS605240 (Sigma Aldrich) nos animais após a infecção com ZIKV ( $4 \times 10^3$ ) por via intravenosa. Como controle experimental foram usados camundongos inoculados a solução veículo – DMSO 3%. O AS605240 foi administrado por via subcutânea na dose de 30mg/kg do animal no esquema de pré-tratamento (administração do composto 1 hora antes da infecção e a cada 24 horas por quatro dias) ou pós-tratamento (administração do composto nos dias 2, 3 e 4 após a infecção). No decorrer do experimento, foram realizadas o monitoramento das medidas do peso e da pressão intraocular (IOP) dos animais. As medições de IOP foram realizadas nos dias 0, 3 e 5 após a infecção pelo ZIKV, utilizando um tonômetro

de aplanção Tono-Pen Vet (Reichert Technologies, NY, USA) que foi calibrado e somente após mensurou a iop como previamente descrito em (FOUREAUX et al, 2015). Para evitar variações as medidas mesmo que em dias diferentes foram realizadas no mesmo horário.

No Dia 5 após a infecção, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via i.p, para coleta de sangue, foi realizada laparotomia mediana seguida pela coleta do sangue em seringas contendo EDTA pela punção da veia cava inferior. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico seguido de deslocamento cervical para a coleta do cérebro para realizar análises como titulação viral, ELISA, histologia e imunohistoquímica ou citometria de fluxo (FIGURA 10).



**Figura 10. Representação esquemática para avaliar o papel do inibidor AS605240 durante a infecção pelo ZIKV.** AS605240 foi administrado 1 hora antes ou 2 dias depois da infecção e a cada 24 horas até a eutanásia (dia 5 da infecção). O peso corporal foi avaliado diariamente e a pressão intraocular foi analisada nos dias 0, 3 e 5. No dia 5 da infecção, o cérebro foi colhido para análises posteriores.

4.6 Determinação dos títulos virais pelo método de Unidades formadoras de placas.

Foi realizado a titulação viral dos cérebros, nervos ópticos e olhos dos camundongos infectados. Para isso, foi realizado o ensaio de placa em células da linhagem VERO CCL-81 (células derivadas de rim do macaco verde africano - Cercopithecus aethiops) (BCRJ código 0343). Inicialmente, as células VERO CCL-81 foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e na presença dos antibióticos penicilina (100U/mL) e gentamicina (50µg/mL). As células foram tripsinizadas, homogeneizadas e plaqueadas em placas de 24 poços

a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço. As placas foram incubadas em uma estufa a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por cerca de 24 horas. O ensaio foi realizado quando os poços apresentaram uma monocamada de células com uma confluência de 90%.

As amostras de cérebro foram pesadas, maceradas com cadinho e pistilo de porcelana estéreis e diluídas serialmente, seguindo a proporção de 10% peso/volume, em meio RPMI com antibióticos, na ausência de SFB. Em cada poço de uma placa foram adicionados 300 $\mu\text{L}$  das diluições ( $10^{-5}$  a  $10^{-8}$ ).

O controle de células foi realizado em um poço sem amostra com vírus, ao qual foi adicionado apenas o meio RPMI 1640 com antibióticos. As placas foram incubadas por uma hora a  $37^\circ\text{C}$  (período de adsorção viral), sendo movimentadas a cada quinze minutos para garantir uma distribuição homogênea das partículas virais sobre a monocamada de células. Após o período de adsorção, o meio foi retirado dos poços e descartado, e as células foram lavadas cuidadosamente com meio RPMI 1640. Em seguida, foi adicionado 1mL por poço de meio RPMI 1640 contendo 1,6% de carboximetilcelulose, antibióticos e 2% de SFB. As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por quatro dias, período no qual os efeitos citopáticos puderam ser observados ao microscópio invertido.

Após este período, as células foram fixadas em formol tamponado a 10% e, posteriormente, corados com solução de cristal violeta a 1% p/v em formol tamponado a 10% durante 2 horas. Posteriormente, os poços das placas foram lavados com água e deixados para secar. A contagem das placas de lise formadas pelo vírus foi realizada manualmente para a determinação do título das amostras, os quais foram expressos em PFU/mL (unidades formadoras de placa).

#### 4.7 Dosagem de citocinas por ELISA

Para dosagem dos mediadores inflamatórios, tais como citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e BDNF) e quimiocinas (CCL-2, CCL-3, CCL-4 e CXCL-1), fragmentos de cérebros foram homogeneizados em solução de PBS 1X contendo inibidor de proteases (0,1mM fenilmetilsulfonil fluoreto; 0,1mM cloreto de benzatonio; 10mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween 20, na proporção de 0,1g de tecido para cada mL de solução. Foi utilizado um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125, Fisher Scientific, Pennsylvania, EUA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester,

VA, EUA) e os sobrenadantes foram recolhidos e estocados em microtubos (Tubo 2mL, Eppendorf do Brasil) a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise.

As amostras de tecidos foram analisadas na diluição 1:2 em PBS contendo 0,1% de albumina bovina (BSA). Foram utilizados kits de anticorpos (R&D Systems, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, EUA). Para a realização do ensaio, os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (pH 7,4), sendo que a sensibilização ocorreu durante 18h a  $4^{\circ}\text{C}$ . A reação foi bloqueada com BSA 1% em PBS. As amostras, os padrões e o branco (albumina 0,1%) foram adicionados aos poços e incubados por 18h. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingen – 1:4000) e revelada com OPD (o-fenilenodiamina dihidroclorato – 59 Sigma-Aldrich, EUA). Após 30 minutos, a reação foi interrompida com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status Labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) em comprimento de onda de 492nm.

#### 4.8 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica

Após a eutanásia dos camundongos, metade do cérebro foi coletada e fixada em formaldeído a 10% em PBS por 48 horas. Posteriormente, foram lavados com água deionizada e mantidos em álcool a 70% até o processamento, que foi realizado através de passagens em etanol com concentrações crescentes, xilol e parafina líquida. Uma vez processados, os tecidos foram incluídos em parafina, cortados em micrótomo e fixados em lâminas histológicas. As lâminas dos cérebros foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E), conforme descrito por Jackman e colaboradores (2018). O grau de inflamação foi quantificado por um patologista que analisou o índice histopatológico do córtex cerebral, hipocampo e inflamação da meninge de maneira cega. As amostras de córtex cerebral foram graduadas da seguinte forma: 0, sem danos; 1, destruição tecidual mínima e/ou gliose/inflamação leve; 2, destruição tecidual leve e/ou gliose/inflamação moderada; 3, destruição tecidual definida (perda neuronal e dano parenquimal) e inflamação intensa; 4, necrose. A inflamação meníngea foi graduada de 0 a 4: 0, sem inflamação; 1 a 4 correspondem a 1 a 4 camadas celulares, respectivamente. A soma dos índices do córtex cerebral e meninge compreendeu o índice final, de até 8 pontos, conforme descrito em (MARIM F et al., 2021; AMARAL et al., 2011).

Para a imunohistoquímica, foi realizada a avaliação do número de células positivas para micróglia (Iba-1), astrócitos (S100 $\beta$ ) e apoptose (Casp-3). Para isso, foram feitas fatias de córtex parafinizadas conforme o processamento descrito anteriormente, e esses cortes foram fixados em lâminas sinalizadas para imunohistoquímica (StarFrost). Em seguida, as lâminas passaram por um protocolo de desparafinização, onde foram imersas duas vezes em xilol absoluto por 15 minutos. Depois, as lâminas passaram por um processo de hidratação, sendo imersas em diferentes concentrações de etanol: etanol absoluto, seguido por etanol 90%, 80%, 70% e água deionizada, durante 5 minutos em cada banho.

Após isso, foi realizada a recuperação antigênica. As lâminas marcadas para IBA-1 foram imersas em solução de citrato (pH 6), sendo que para CASP-3 e S100 $\beta$  as lâminas foram imersas em solução de EDTA (pH 8) durante 20 minutos a 96 graus. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com água deionizada e incubadas com o bloqueio de reações inespecíficas (solução de peróxido de hidrogênio, dois banhos de 15 minutos cada) e com bloqueio de ligações inespecíficas (protein block - ABCAM durante 5 minutos).

Após isso, os anticorpos primários para micróglia (Iba-1), astrócitos (S100 $\beta$ ) e apoptose (Casp-3) foram incubados por 18 horas. Depois, as lâminas foram incubadas com o respectivo anticorpo secundário por 30 minutos e incubadas durante 30 minutos com estreptavidina-peroxidase (KIT ABC - ABCAM). Em seguida, elas foram reveladas com DAB (Dako) durante 30 segundos cada uma. Após, as lâminas foram coradas com hematoxilina e depois passaram por uma bateria de etanol para desidratação: etanol 70%, 80%, 90% e absoluto, durante 5 minutos em cada banho. Por fim, antes da montagem da lâmina com a lamínula, as lâminas passaram por três banhos de xilol absoluto durante 5 minutos, conforme descrito em (MARIM F et al., 2021).

#### 4.9 Citometria de Fluxo

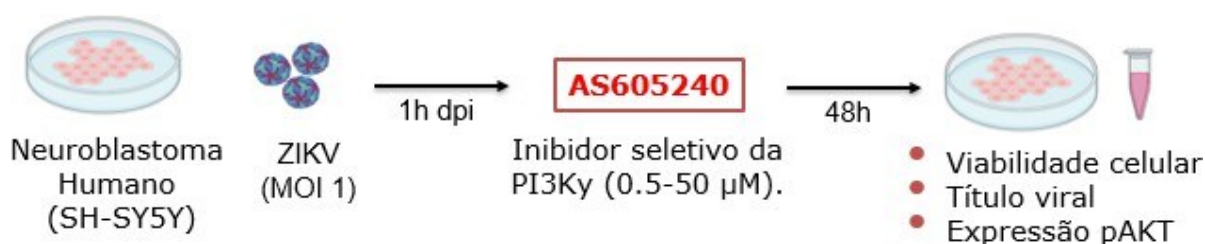
Imunofenotipagem de células do cérebro dos animais serão realizadas, os cérebros serão macerados em cadinho de porcelana e a suspensão de células em meio de cultura filtrada em filtros de 70 $\mu$ m (Falcon) para isolar células. A citometria de fluxo será realizada seguindo a metodologia descrita por (ZAIDAN et al., 2022). Para isto avaliaremos diferentes subpopulação de células imune com base em marcadores moleculares de cada subconjunto de células: células T CD4 + (CD4 + /CD3 + ), células

T CD8 + (CD8 + /CD3 + ), células T regulatórias (Foxp3 + /CD4 + /CD3 + ), células NK (CD3 – /NK + ), os macrófagos (CD45+Gr-1-F4/80+), monócitos(CD45+Gr-1+F4/80+) e neutrófilos (CD45+Gr-1+F4/80-). No mesmo subconjunto de células avaliaremos também receptores e mediadores como TNF, IFN-  $\gamma$ , iNOS, CD206 e IL-10.

#### 4.10 Cultura de Neuroblastoma humano e ensaio de citotoxicidade

Para avaliar a viabilidade celular e o título viral em células de neuroblastomas humanas infectadas pelo ZIKV, tratadas ou não com o inibidor da PI3K $\gamma$ . Para isso, os neuroblastomas humanos foram implantados em microplacas de 96 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço) e incubados a 37°C por 24 horas em uma estufa de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram infectadas com 100  $\mu$ L de ZIKV (MOI 1) diluído em DMEM sem suplementação de SFB, por uma hora. Após o período de adsorção, o meio de cultivo infectado foi removido e substituído por 200  $\mu$ L de novo meio DMEM F12, suplementado com 10% de SFB, com ou sem o inibidor AS605240.

Após 48 horas de incubação, o meio de cultura foi coletado e armazenado para análises posteriores, incluindo titulação viral, LDH e ELISA (FIGURA 11). Para avaliar a viabilidade celular, foi adicionado 10  $\mu$ L de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (2 mg/mL diluídos em PBS 1X) nas células ainda aderidas na placa. Após 90 minutos de incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi descartado e 100  $\mu$ L de DMSO foram adicionados em cada poço. A placa foi homogeneizada e a absorbância do comprimento de onda ( $\lambda = 540$  nm) de cada poço foi medida em um espectrofotômetro de ELISA.



**Figura 11. Representação esquemática da estratégia experimental para avaliar os efeitos terapêuticos do inibidor PI3K $\gamma$  AS605240 e a expressão de pAKT.** Primeiramente, as células SH-SY5Y foram infectadas pelo ZIKV (MOI 1). Posteriormente, foram tratadas ou não com o inibidor AS605240 nas concentrações de 0,5; 5; e 50  $\mu$ M. Após 48 horas, foram realizadas análises de viabilidade celular e título viral nas células de neuroblastoma. Para avaliar a fosforilação da AKT em resposta ao inibidor da PI3K $\gamma$ , o lisado celular foi coletado após 48 horas dos grupos infectados ou não infectados, tratados ou não com o inibidor AS605240 na concentração de 0,5  $\mu$ M.

#### 4.11. Ensaio de lactato-desidrogenase (LDH)

O LDH foi realizado usando o kit Bioclin e Triton como controle positivo. Para realizar o ensaio, uma alíquota (4  $\mu$ L) do sobrenadante celular de cada poço foi transferido para uma placa de microtitulação de 96 poços e 200  $\mu$ L do reagente LDH (reagente 1: tamponado substrato e reagente 2: coenzima, na proporção 1:5) foi adicionado. A absorbância foi medida a 340 nm em um leitor de microplacas imediatamente após adicionar o LDH reagente e 1, 3 e 4 minutos depois. A viabilidade celular foi calculado usando a seguinte equação (Kit Bioclin LDH):  $\Delta/\text{min} = [(Absorbância\ 1^a\ leitura - Absorbância\ 2^a\ leitura) + (Absorbância\ 3^a\ leitura - Absorbância\ 4^a\ leitura)] / 2 \times 20794,34$ , onde o número é um fator de correção fornecido pelo fabricante do kit.

#### 4.12 Análise Estatística

Os cálculos estatísticos como teste t e anova foram realizados por meio do programa GraphPad PRISM 7 2017®. Os resultados com um valor de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

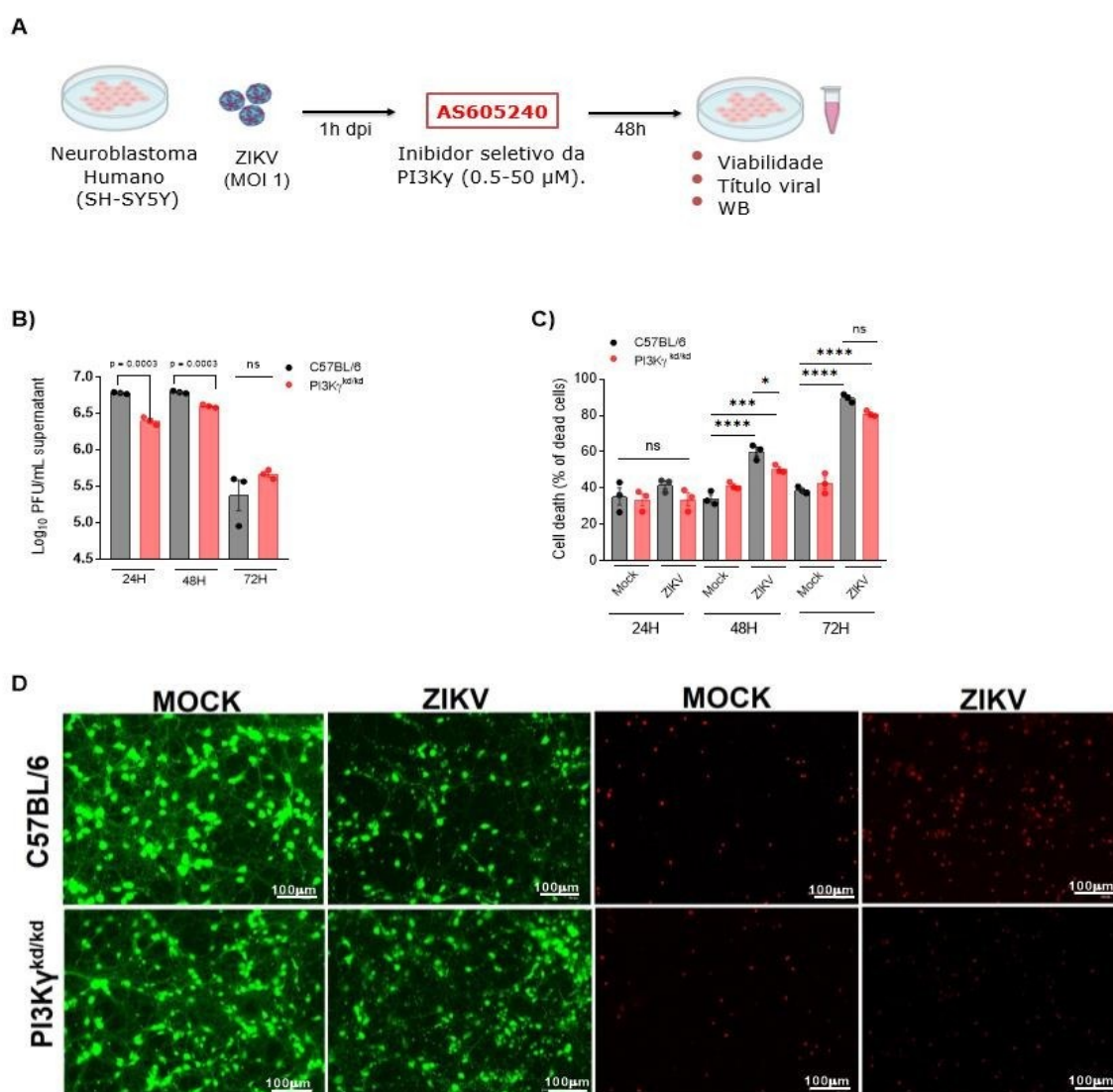
### 5.RESULTADOS

5.1 Redução da morte neuronal e do título viral em neurônios derivados de embriões deficientes para a enzima catalítica PI3K $\gamma^{kd/kd}$

Estudos realizados pelo nosso grupo revelaram que neurônios primários têm alta suscetibilidade à infecção pelo ZIKV, resultando em morte neuronal (COSTA & DEL SARTO et al., 2017; MARIM et al., 2021). Como a via PI3K/AKT desempenha um papel crucial na sobrevivência celular, investigamos se a ativação da via PI3K $\gamma$  poderia modular a replicação do ZIKV e a morte neuronal induzida pelo vírus. Para isso, realizamos a cultura primária de neurônios derivadas do córtex e estriado de embriões C57BL/6 (WT) e PI3K $\gamma^{kd/kd}$  que são portadores de uma mutação de perda de função da PI3K $\gamma$ . Após 5 dias de cultivo, infectamos com ZIKV (MOI 0,1) as células neuronais por 24, 48 e 74 horas. Após, o sobrenadante foi coletado para avaliação do título viral por ensaio de placas e as células foram submetidas a ensaios de viabilidade celular utilizando o ensaio *LIVE/DEAD* (Figura 12A). Nos tempos de 24 e 48 horas após a infecção, observou-se que os neurônios primários derivados de embriões WT

apresentaram uma maior replicação viral em comparação com os neurônios primários sem atividade catalítica da enzima PI3K $\gamma$  (Figura 12B). No tempo mais tardio, de 72 horas, não houve diferença significativa entre os grupos.

Ao avaliar a morte neuronal, inicialmente, no tempo de 24 horas, não se observou diferença significativa entre os grupos infectados e não infectados. Contudo, em 48 horas após a infecção, os neurônios de embriões WT apresentaram maior morte neuronal em comparação com os neurônios derivados de embriões PI3K $\gamma^{kd/kd}$  (Figuras 12C-D). No tempo mais tardio, de 72 horas, não se observou diferença na morte neuronal entre os neurônios derivados de embriões WT e PI3K $\gamma^{kd/kd}$ . Esses resultados sugerem que a inibição da via PI3K $\gamma$  reduz a replicação viral, implicando diretamente na redução da morte neuronal. Em conjunto, estes achados indicam que a inibição da via PI3K $\gamma$  é benéfica durante a infecção pelo ZIKV em células neurais murinas.



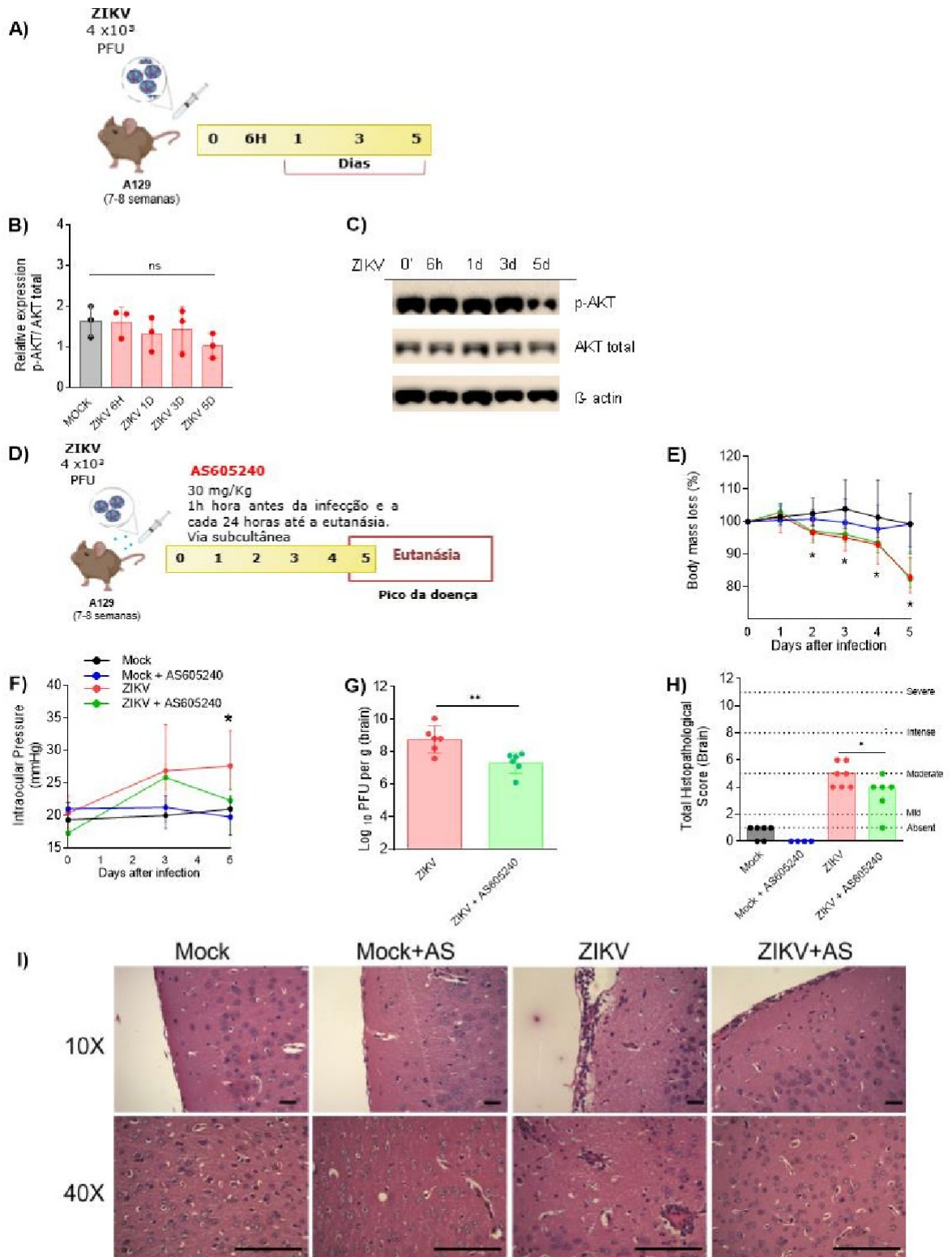
**Figura 12. Cultivo de neurônios deficientes para PI3Ky apresentam reduzida carga viral e morte celular após infecção pelo ZIKV.** A cultura primária de neurônios foi realizada a partir de embriões de camundongos C57BL/6; deficiente para a subunidade catalítica da enzima (PI3K<sub>γ</sub>kd/kd). Após 24, 48 e 72 horas da infecção pelo ZIKV (A), o sobrenadante foi coletado para avaliar o título viral (B) e a morte celular (C) foi avaliada usando o ensaio de viabilidade celular *LIVE/DEAD*. (D) Imagens representativas no tempo de 48 horas de neurônios infectados ou não infectados pelo ZIKV. Esses foram corados com calceína AM (verde indica células vivas) e homodímero de etídio (vermelho indica células mortas). As barras indicam os valores médios e como representam o desvio padrão. \*0,01 < P < 0,05; \*\*0,001 < P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; e \*\*\*\*P < 0,0001.

## 5.2 A inibição do PI3Ky melhora a doença induzida pelo ZIKV

Em seguida, investigamos a influência da via PI3Ky durante a infecção pelo ZIKV *in vivo*. Camundongos A129<sup>-/-</sup>, que são suscetíveis à infecção por ZIKV (COSTA;

DEL SARTO et al., 2017), foram inoculados por via intravenosa com ZIKV ( $4 \times 10^3$  PFU) e tiveram seu cérebro coletado em vários momentos diferentes após a infecção, como: 6 horas, 1, 3 e 5 dias (Figura 13A). A infecção pelo ZIKV não alterou a ativação da AKT no cérebro dos animais, uma vez que a AKT fosforilada (pAKT) não apresentou alteração nos diferentes dias de infecção quando comparada com o grupo mock (não infectado) (Figura 13B - C).

Posteriormente, para investigar a via PI3K $\gamma$  na patogênese do ZIKV, realizamos outro delineamento experimental no qual tratamos camundongos A129<sup>-/-</sup> com um inibidor seletivo de PI3K $\gamma$  (AS605240; 30 mg/kg) uma hora antes da infecção pelo ZIKV ( $4 \times 10^3$  PFU) e a cada 24 horas até a eutanásia, realizada no 5º dia pós-infecção (dpi). Em nosso modelo experimental, o 5 dpi corresponde ao pico da doença induzida pelo ZIKV (Figura 13D). Como resultado, a infecção pelo ZIKV induziu uma perda significativa de peso nos camundongos, que não foi revertida pelo tratamento com AS605240 (Figura 13E). No entanto, ao avaliarmos outros parâmetros, observamos que o ZIKV aumentou a pressão intraocular a partir do 3º dia de infecção, e a inibição da via PI3K $\gamma$  foi capaz de reduzir essa pressão no 5º dpi (Figura 13F). A replicação viral nos grupos infectados, verificamos que os camundongos tratados com o inibidor da via PI3K $\gamma$  apresentaram uma redução de mais de 1 log no título viral em comparação com o grupo apenas infectado (Figura 13G). Além disso, na análise histopatológica, os camundongos sem tratamento, apenas infectados pelo ZIKV, apresentaram maior escore de meningite, maior ativação de vasos sanguíneos no córtex com sinais de hiperemia, maior infiltrado de células inflamatórias e também gliose, quando comparados com camundongos que receberam o tratamento com o inibidor AS605240 após a infecção pelo ZIKV (Figuras 13H-I). Esses dados sugerem que a inibição farmacológica do PI3K $\gamma$  desempenha um papel neuroprotetor no contexto da infecção por ZIKV.

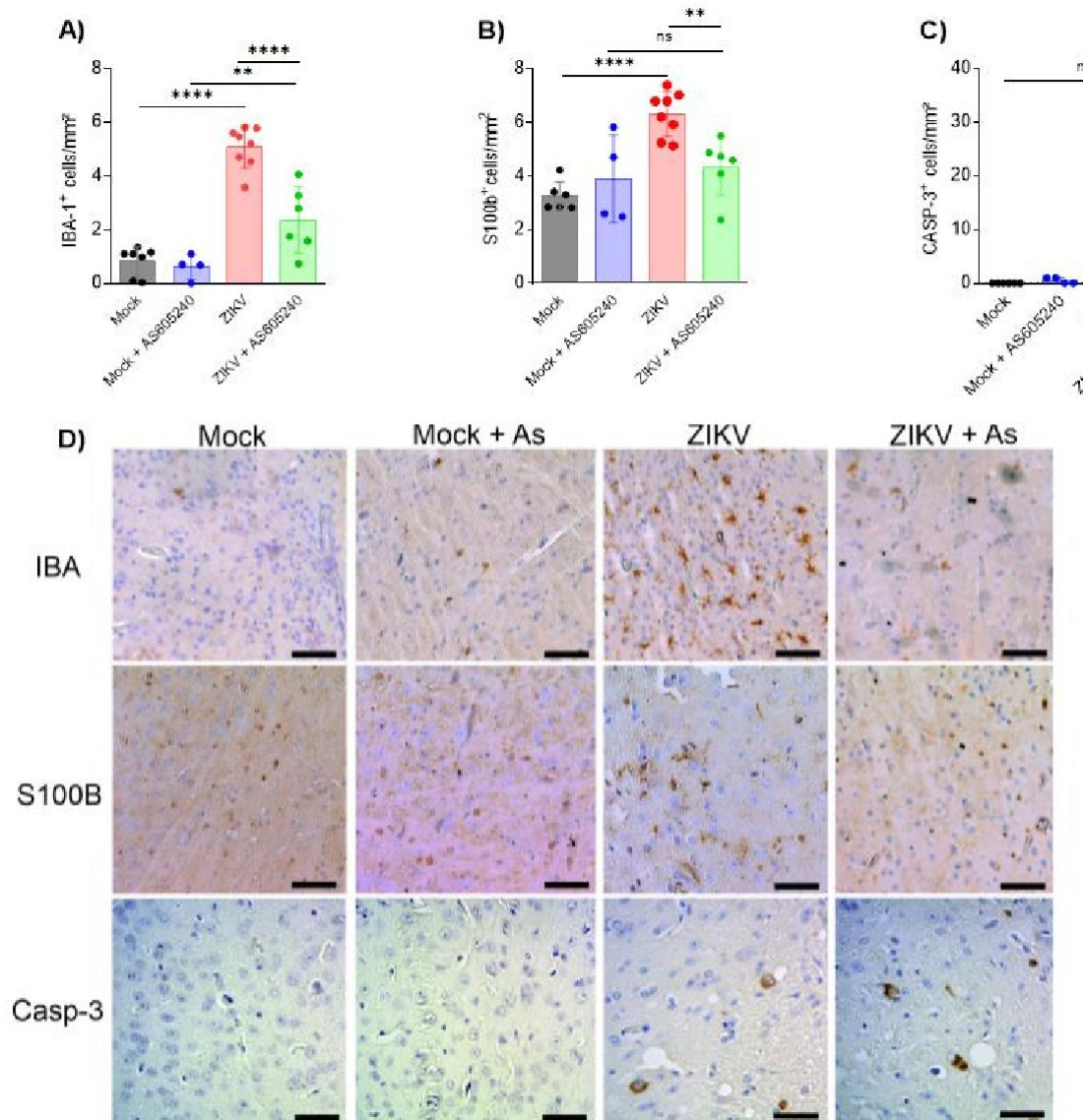


**Figura 13.** O inibidor da via PI3Ky melhora os parâmetros clínicos, reduz os títulos virais e a lesão cerebral em camundongos A129 infectados pelo ZIKV. (A) Representação esquemática da estratégia experimental, camundongos A129 foram inoculados (iv) com  $4 \times 10^3$  PFU/200 $\mu$ L de ZIKV e depois sacrificados em diferentes momentos de infecção para avaliar a expressão de pAKT. (B)

quantificação representativa da imagem (C) da expressão pAKT no cérebro dos animais após a infecção. (D) Representação esquemática da estratégia experimental para avaliar o papel do inibidor AS605240 durante a infecção pelo ZIKV. AS605240 foi administrado 1 hora antes da infecção e a cada 24 horas até a eutanásia (dia 5 da infecção). (E) O peso corporal foi avaliado diariamente e (F) a pressão intraocular foi analisada nos dias 0, 3 e 5. No dia 5 da infecção, o cérebro foi colhido para (G) análise de ensaio de placa e para (H) análise semiquantitativa (histopatológica). pontuação) após coloração H&E de seções cerebrais. (I) Imagens representativas de seções cerebrais. As barras indicam os valores médios e como representam o desvio padrão. \*0,01 < P < 0,05; \*\*0,001 < P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; e \*\*\*\*P < 0,0001.

5.3 A inibição da PI3K $\gamma$  reduz a neuroinflamação induzida pelo ZIKV sem alterar os níveis de citocinas pró ou anti-inflamatórias.

Foi demonstrado que o ZIKV promove a neuroinflamação ao infectar e ativar células da glia, particularmente micróglia e astrócitos, levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias (MARIM et al., 2021). Para investigar a influência da via PI3K $\gamma$  nas alterações celulares causadas pelo ZIKV, realizamos uma imunocoloração para quantificar o número de células mielóides, como macrófagos residentes ou micróglia (IBA-1+) e astrócitos (S100 $\beta$ +) (Figura 14A). Conforme descrito na literatura, no modelo experimental atual, a infecção pelo ZIKV induziu um aumento significativo no número de macrófagos/micróglia (IBA-1+) (Figura 14A) e de astrócitos (S100 $\beta$ +) (Figura 14B) no córtex cerebral. Em contrapartida, a inibição de PI3K $\gamma$  com AS605240 foi capaz de reduzir o número de células positivas para IBA-1 (Figura A e D) e evitar o aumento de células positivas para S100 $\beta$  induzido durante a infecção pelo ZIKV (Figuras 14B e D). Além disso, investigamos se a morte induzida pelo ZIKV nos grupos tratados ou não com AS605240 era causada por apoptose, medindo a presença de caspase-3 clivada (Figura 14C-D). Considerando que a via PI3K/AKT está relacionada à sobrevivência celular e sua inibição leva à apoptose, esperávamos ver diferenças entre os grupos. No entanto, nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa na quantidade de caspase-3 clivada no córtex cerebral entre os grupos infectados e não infectados.

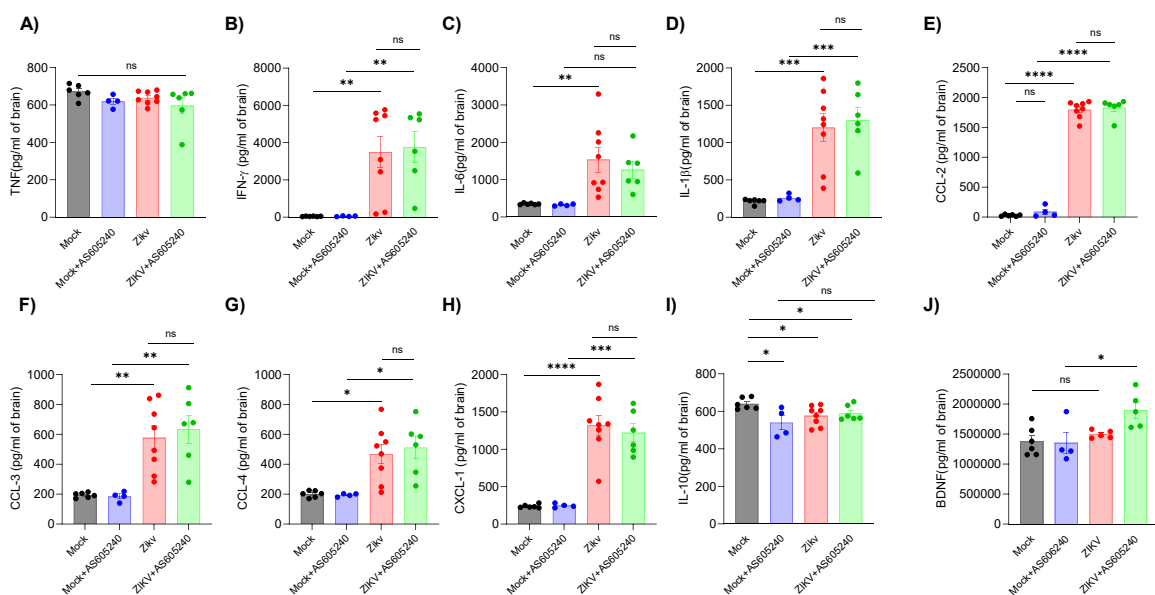


**Figura 14. O tratamento com inibidor de PI3Ky reduziu a ativação de células inflamatórias no cérebro induzida pela infecção por ZIKV.** A imunohistoquímica de (A) IBA-1+, (B) S100B e (C) CASP-3 clivada foi realizada no cérebro de camundongos a 5 dpi. (D) Imagens representativas de seções cerebrais. As barras indicam os valores médios e como representam o desvio padrão. \*0,01 < P < 0,05; \*\*0,001 < P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; e \*\*\*\*P < 0,0001.

Sabe-se que os neurônios e as células gliais podem desempenhar papéis cruciais no processo de neuroinflamação, liberando principalmente citocinas e quimiocinas durante a infecção por Zika (FOK-MOON L et al., 2017). Portanto, buscamos compreender melhor o ambiente inflamatório induzido pelo ZIKV e o efeito do tratamento com inibidor da via da PI3Ky diante a infecção pelo ZIKV, quantificando citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  e quimiocinas CCL-2, CCL3, CCL4 e CXCL-1.

Embora o TNF não tenha apresentado diferença entre os grupos infectados e não infectados (mock), nossos resultados demonstraram que o ZIKV induziu um aumento significativo das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  no tecido cerebral. O tratamento com inibidor da PI3K $\gamma$  não foi capaz de alterar os níveis dos mediadores avaliados (Figura 15A-D). Da mesma forma, o ZIKV aumentou a liberação das quimiocinas CCL-2, CCL-3, CCL-4 e CXCL-1 (Figura 15E-H) durante a infecção em comparação com o grupo mock, e o tratamento com inibidor da PI3K $\gamma$  novamente não foi capaz de diminuir ou evitar esse aumento induzido pela infecção.

Posteriormente, considerando que a sinalização mediada pela PI3K pode regular as respostas inflamatórias e induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (ANTONIV et al., 2011). Avaliamos se o tratamento com o inibidor AS605240 teria algum efeito na IL-10 e no fator neurotrófico BDNF, que é crucial para a homeostase neuronal, durante a infecção pelo ZIKV. Nossos resultados mostraram que os grupos infectados com ZIKV e os grupos tratados com inibidor da PI3K $\gamma$  reduziram a de IL-10 (Figura 15I). No entanto, ao comparar os grupos infectados e infectados tratados, não houve diferença significativa. Ao dosar os níveis do BDNF nos cérebros dos animais (Figura 15H), observamos que a quantidade de BDNF no grupo tratado com AS605240 e infectado pelo ZIKV foram maiores que nos demais grupos. Isso pode conferir efeitos protetores adicionais aos neurônios durante a infecção (LIMMA et al 2019).



**Figura 15. O tratamento com inibidor de PI3K $\gamma$  não alterou o aumento de citocinas e quimiocinas induzida durante a infecção pelo ZIKV. A produção de citocinas pró-inflamatórias (A-D), quimiocinas**

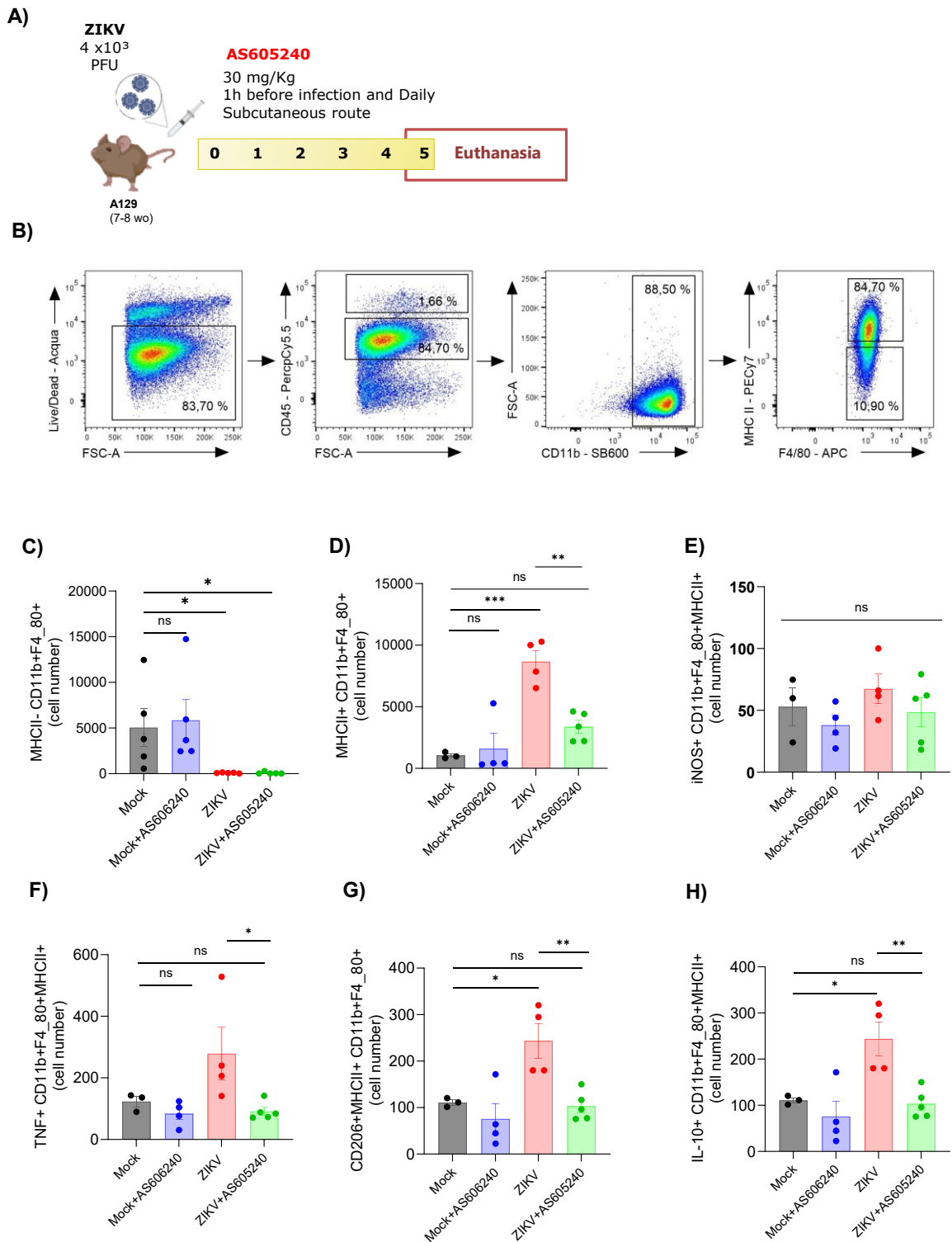
(E-H), citocina anti-inflamatório (I) e fatores neurotróficos (J) foram avaliadas em cérebros de camundongos. As barras indicam os valores médios e como representam o desvio padrão. \* $0,01 < P < 0,05$ ; \*\* $0,001 < P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; e \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

#### 5.4 A inibição da PI3Ky suprime a ativação celular induzida pela infecção pelo ZIKV

##### 5.4.1 Populações de células mielóides

O próximo passo em nosso estudo foi investigar os efeitos da inibição da PI3K nas populações de células mielóides e linfóides no cérebro de camundongos infectados pelo ZIKV. Para este experimento, camundongos A129<sup>-/-</sup> foram inoculados por via intravenosa com  $4 \times 10^3$  PFU de ZIKV. Uma hora antes da infecção, os camundongos foram tratados com AS605240 (30 mg/kg), com doses subsequentes administradas a cada 24 horas até 5 dias pós-infecção (dpi). Amostras de cérebros foram coletados no 5 dpi para citometria de fluxo (Figura 16A). Gráficos de densidade representativos mostram a estratégia de controle utilizada para identificar células micróglia ativadas (CD45<sup>int</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>) (Figura 16B). Nossos resultados demonstraram que a infecção pelo ZIKV induziu a ativação da micróglia (Figuras 16C-D). Por outro lado, o tratamento com AS605240 preveniu essa ativação induzida pela infecção pelo ZIKV (Figura 16D).

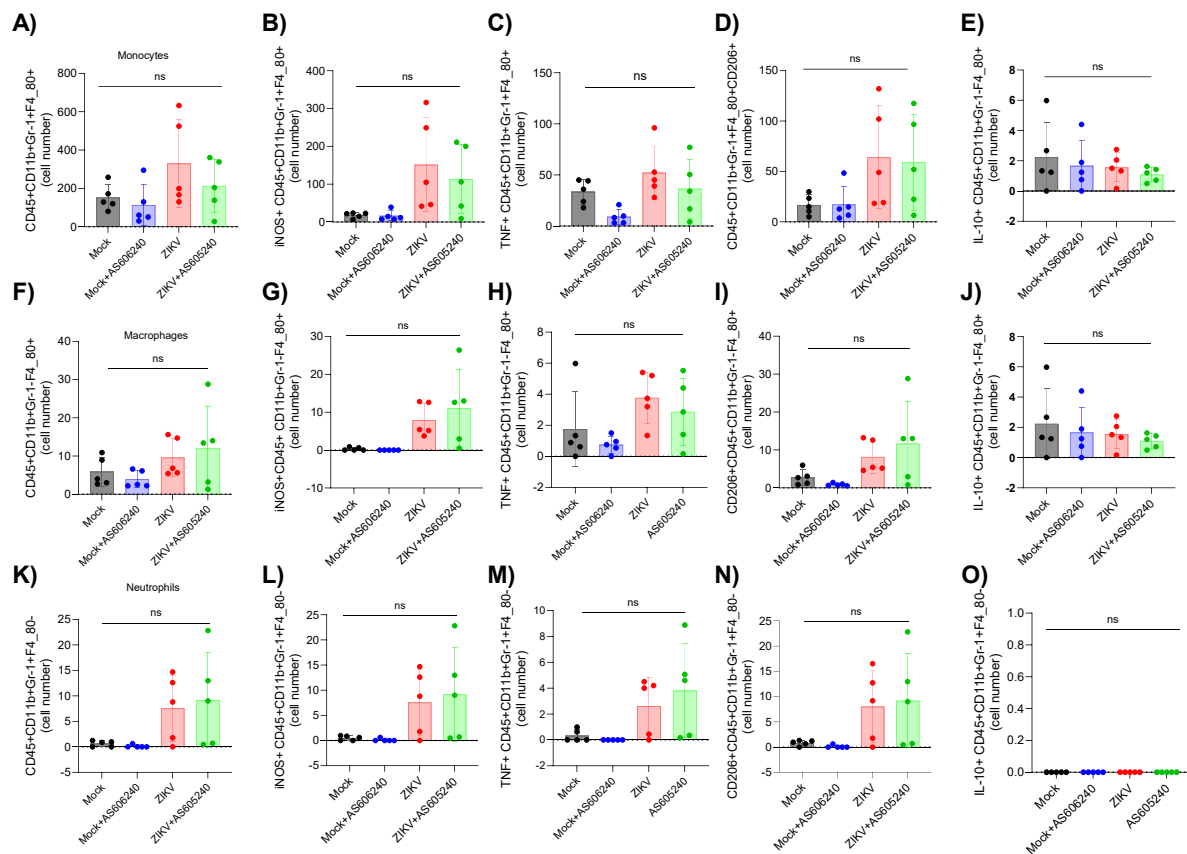
Para avaliar o perfil inflamatório, caracterizamos a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como iNOS e TNF. Nossos resultados mostraram que, embora não houvesse alteração na expressão de iNOS nas micróglia ativadas entre os grupos (Figura 16E), a infecção pelo ZIKV aumentou significativamente os níveis de TNF na micróglia ativada (Figura 16F). Adicionalmente, o tratamento com AS605240 foi capaz de prevenir o aumento de TNF causado pelo ZIKV na micróglia ativada durante a infecção (Figura 16F). Além disso, observamos que o ZIKV aumentou tanto a expressão do receptor de manose (CD206<sup>+</sup>) quanto a produção de IL-10. E o tratamento com AS605240 diminuiu não apenas a expressão do receptor CD206, mas também reduziu a produção de IL-10 (Figuras 16G-H) nas micróglia ativadas.



**Figura 16. O inibidor da via PI3Ky diminui a ativação microglial e a produção de TNF induzida pela infecção pelo ZIKV.** (A) Esquema de infecção por ZIKV e tratamento com AS605240. (B) Gráficos de densidade representativos da proporção de (CD45<sup>int</sup>), (CD11b<sup>+</sup>), micróglia ativada (F4/80<sup>+</sup>/MHC-I<sup>+</sup>) de um único cérebro infectado pelo ZIKV. (C) Micróglia (CD45<sup>int</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>MHC-I<sup>-</sup>), (D) Micróglia ativada (CD45<sup>int</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>MHC-I<sup>+</sup>), (E) Micróglia ativada expressando receptor de

manose (CD45intCD11b+F4/80+MHC-I+CD206+). (E) Micróglia produtora de IL10 (CD45intCD11b+F4/80+MHC-I+IL-10+), (F) atividade de iNos (CD45intCD11b+F4/80+MHC-I+iNos+) e (G) liberação de TNF (CD45intCD11b +F4/80+MHC-I+TNF+). As barras indicam os valores médios e como representam o desvio padrão. \*0,01 < P < 0,05; \*\*0,001 < P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; e \*\*\*\*P < 0,0001.

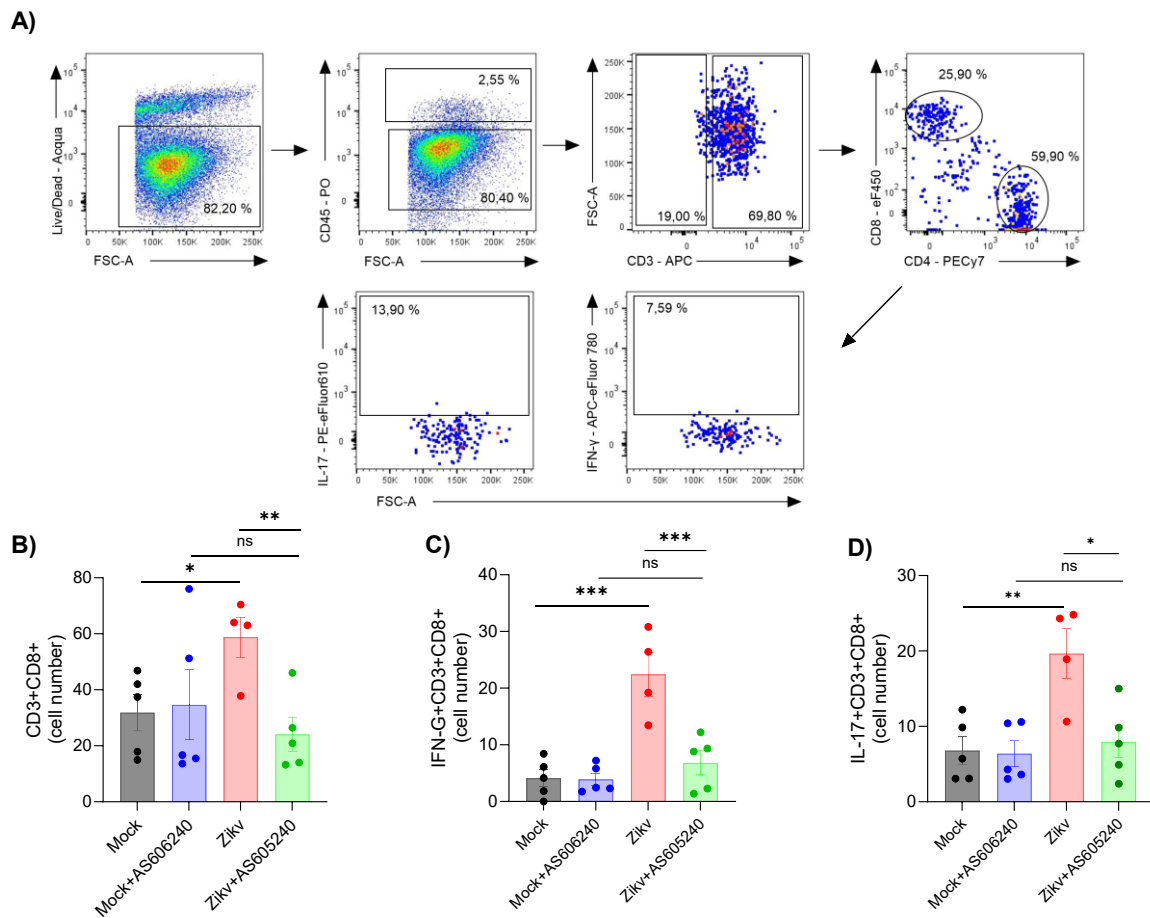
Ao avaliar outras populações de células mieloides, não foram observadas alterações no número ou na produção de mediadores pro-inflamatórios e anti-inflamatórios por monócitos, macrófagos e neutrófilos no grupo tratado com AS605240 e infectado pelo ZIKV em comparação com os grupos mock ou controle infectado pelo ZIKV (Figura 17A-O). No geral, estes resultados sugerem que em células mieloides, o tratamento com AS605240 previne a ativação microglial e modula a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, potencialmente melhorando a resposta à infecção pelo ZIKV.



**Figura 17. A infecção pelo ZIKV e a inibição da via da PI3Ky não alteraram a ativação ou liberação de mediadores em outros tipos células mieloides.** (A-E) Números de monócitos inflamatórios (CD45+CD11b+Gr-1+F4\_80+), (F-J) Macrófagos (CD45+CD11b+Gr-1+F4\_80+) e (K-O) neutrófilos (CD45+CD11b+Gr-1+F4\_80-), liberando produtores de de iNOS+, IFN $\gamma$ +, IL-10 e expressando receptor de manose CD206+. As barras indicam os valores médios e como representam o desvio padrão. \*0,01 < P < 0,05; \*\*0,001 < P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; e \*\*\*\*P < 0,0001.

#### 5.4.2 Populações de células linfóides

Durante uma infecção viral aguda no SNC, a ativação da micróglia e dos astrócitos pode contribuir para o recrutamento de células linfóides, principalmente células T com atividade antiviral, que por sua vez exercem controle da replicação viral através de mecanismos indiretos, como a liberação de citocinas e ativação de outras células. Porém, já foi descrito que na infecção pelo ZIKV, o excesso dessas citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ , mediado por células citotóxicas T CD8+, pode danificar estruturas neuronais e promover apoptose neuronal (SATCHIDANANDAM et al., 2021; KREUTZFELDT et al., 2013; GARBER et al., 2019). Por causa disso, investigamos células TCD8+ diante do tratamento e infecção pelo ZIKV. Gráficos de densidade representativos mostraram a estratégia de controle usada para células T CD8+ (CD45<sup>high</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) (Figura 18A). Nossos resultados demonstraram que o ZIKV induz um aumento no número de células T CD8+ e que o tratamento com o inibidor AS605240 reduziu o número de células T CD8+ (Figura 18B). A infecção pelo ZIKV aumenta a liberação de mediadores pró-inflamatórios (INF- $\gamma$  e IL-17) em células TCD8+. No entanto, o tratamento com o inibidor AS605240 foi capaz de reduzir a produção desses mediadores, tanto INF- $\gamma$  quanto IL-17 (Figura 18C-D) induzidos durante a infecção pelo ZIKV. Com base nisso, nossos resultados indicam que a inibição da via PI3K $\gamma$  pode estar beneficiando a condição causada pelo ZIKV, uma vez que a inibição está associada à diminuição da inflamação no SNC e à redução da morte neuronal durante a infecção pelo ZIKV.

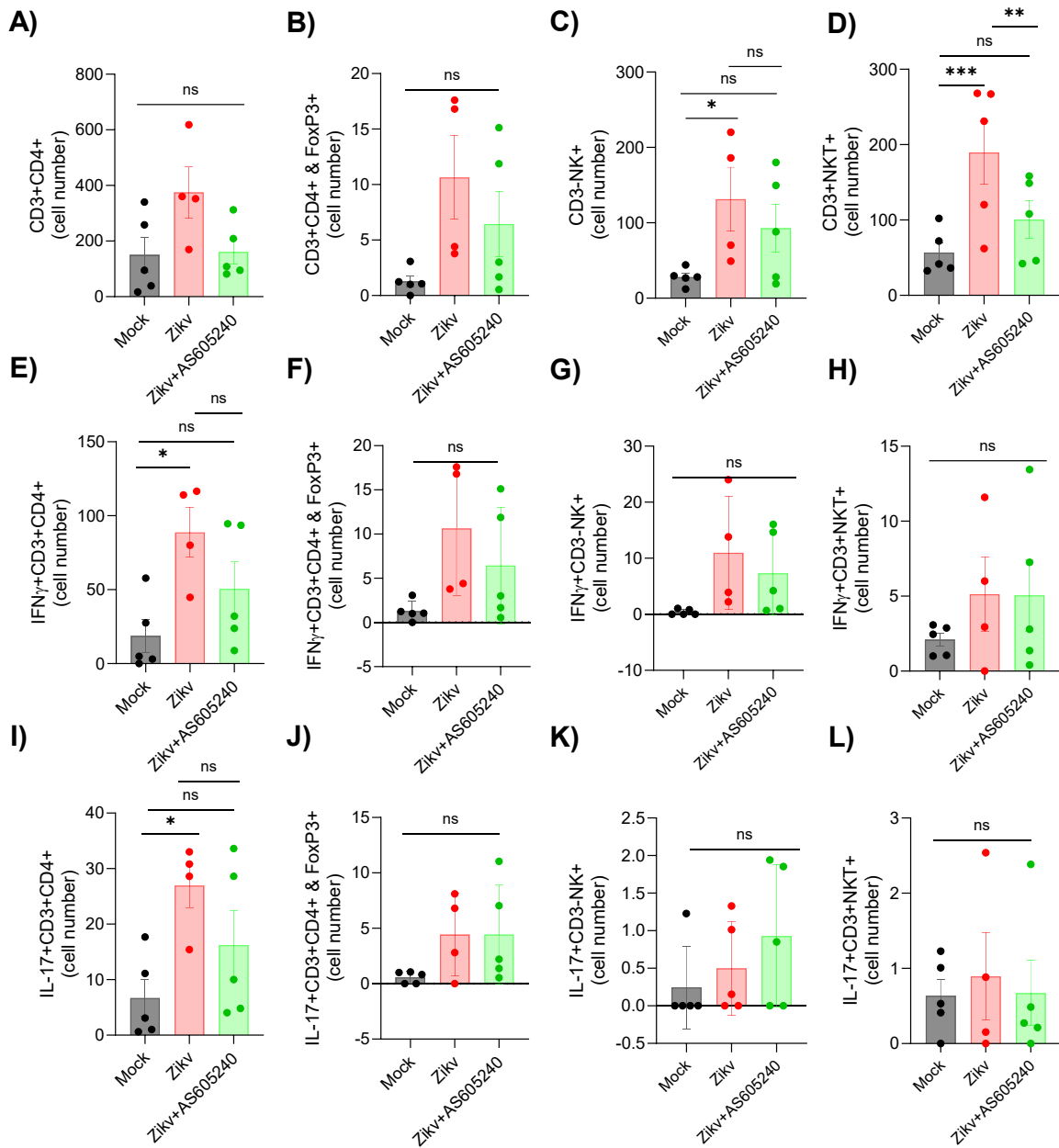


**Figura 18. O tratamento com inibidor da via PI3K $\gamma$  diminui a ativação de CD8 T e a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 desencadeada pela infecção pelo ZIKV.** (A) Gráficos de densidade representativos da proporção de células T (CD45<sup>high</sup>), (CD3<sup>+</sup>), CD8 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) de um único cérebro infectado pelo ZIKV. (B) Célula T CD8 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). (C) Célula T CD8 produtora de IFN- $\gamma$  expressando (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ ), (E) Célula T CD8 produtora de IL17 (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>), Barras indicam média valores e como eles representam o desvio padrão. 0,01 < P < 0,05; \*\*0,001 < P < 0,01; \*P < 0,001; e \*\*\*P < 0,0001.

Ao investigar outras populações de células linfóides, não foram observadas alterações nos números de células T do tipo CD4<sup>+</sup> (Figura 19A) e T Reg<sup>+</sup> (Figura 19B). No entanto, ao examinar a população de células NK<sup>+</sup> (Figura 19C), observamos que o ZIKV aumentou o número de células NK<sup>+</sup> em comparação com o grupo Mock. Já na população de células NKT<sup>+</sup> (Figura 19D), observamos que, além do ZIKV aumentar o número de células NKT<sup>+</sup>, o tratamento com o inibidor da PI3K $\gamma$  foi capaz de reduzir o número dessas células durante a infecção.

Ao investigar a produção dos mediadores pró-inflamatórios IFN- $\gamma$  (Figura 19E-H) e IL-17 (Figura 19I-L) nessas populações celulares, constatamos que não houve diferença estatística entre os grupos infectados e não infectados. No geral, esses resultados sugerem que, em populações de células linfóides, o tratamento com AS605240 reduz a ativação de células T CD8<sup>+</sup> e NKT, além de modular a produção de

citocinas pró-inflamatórias em células T CD8+, potencialmente melhorando a resposta à infecção pelo ZIKV.

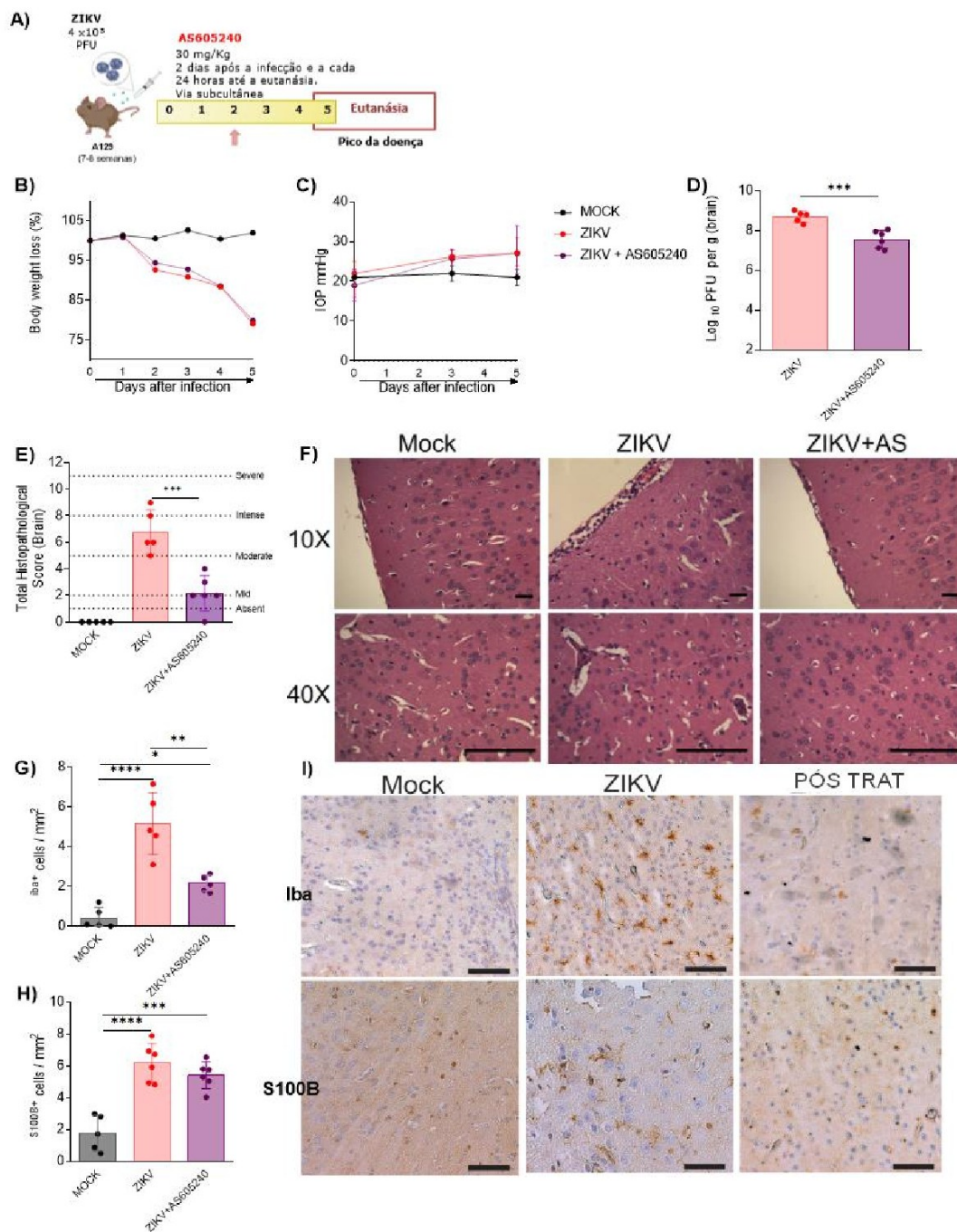


**Figura 19** Efeitos da infecção pelo ZIKV e do inibidor PI3K $\gamma$  nas populações de células linfoides e na produção de citocinas pró-inflamatórias. (A) Números de células T CD4+ (CD3+CD4+), (B) T Reg (CD3+CD4+ & FoxP3+), (C) NK+ (CD3-NK+), (D) NKT+ (CD3+NKT+), liberando (E-H) produtores de IFN- $\gamma$  e (I-L) IL-17. As barras indicam os valores médios e como representam o desvio padrão.

\*0,01 < P < 0,05; \*\*0,001 < P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; e \*\*\*\*P < 0,0001.

5.4 A inibição terapêutica de PI3K $\gamma$  reduz a replicação do ZIKV e mitiga os danos cerebrais induzidos pelo ZIKV.

Para avaliar o potencial terapêutico da inibição de PI3K $\gamma$ , o tratamento com AS605240 (30mg/kg) foi iniciado no 2º dia pós-infecção e continuado diariamente até a eutanásia (Figura 20A). Amostras de cérebro, nervo óptico e olhos foram coletadas cinco dias após a infecção. Embora tenha ocorrido perda significativa de peso corporal devido à infecção pelo ZIKV, o tratamento com AS605240 iniciado no 2º dia pós-infecção não reverteu esse efeito (Figura 20B). A infecção pelo ZIKV levou ao aumento da pressão intraocular (PIO), e não houve diferenças significativas observadas em comparação ao grupo infectado e tratado com AS605240 (Figura 20C). No entanto, quando quantificamos os vírus viáveis, observamos que o tratamento com AS605240 reduziu efetivamente os títulos virais (Figura 9D), inflamação e danos histopatológicos nos cérebros dos camundongos tratados em comparação com o grupo apenas infectados pelo ZIKV (Figuras 20E-F). A análise de imunocoloração revelou uma diminuição nas células IBA-1+ sem alterações nas células S100 $\beta$ + em camundongos tratados em comparação com o grupo de veículos ZIKV (Figuras 20G-I). Assim, a inibição do PI3K $\gamma$  apresenta oportunidades terapêuticas promissoras para mitigar a replicação do ZIKV e lesões cerebrais associadas.



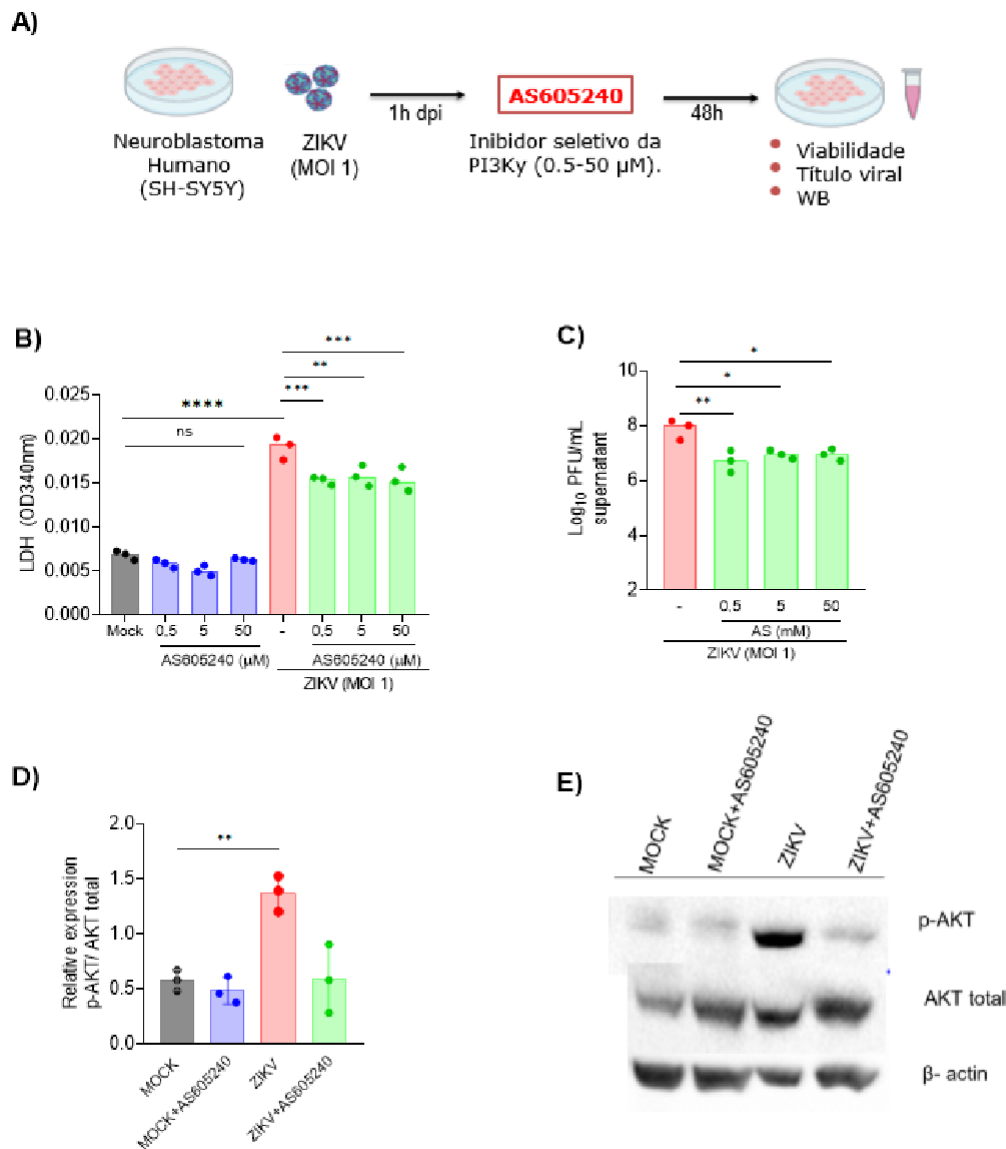
**Figura 20.** A administração terapêutica com o inibidor da via PI3Ky reduz os títulos virais, a lesão e a inflamação induzidas pelo ZIKV. (A) Representação esquemática da estratégia experimental, camundongos A129 foram inoculados (iv) com  $4 \times 10^3$  PFU/200 $\mu$ L de ZIKV. 2 dias após a infecção, os camundongos foram tratados com AS605240 (30 mg/kg) a cada 24 horas durante 5 dias. (B) O peso corporal foi avaliado diariamente e (C) a pressão intraocular foi analisada nos dias 0, 3 e 5. No dia 5 da infecção, o cérebro foi colhido para (D) análise de ensaio de placa e para (E) análise semiquantitativa (histopatológica). pontuação) após coloração H&E de seções cerebrais. (F) Imagens representativas de seções cerebrais. Imunocolorações de (G) IBA-1+, (H) S100- $\beta$  e (H) Imagens representativas de seções cerebrais. As barras indicam os valores médios e como representam o desvio padrão. \*0,01 <

$P < 0,05$ ;  $**0,001 < P < 0,01$ ;  $***P < 0,001$ ; e  $****P < 0,0001$ .

5.5 Os neuroblastomas humanos são protegidos pelo tratamento terapêutico com o inibidor AS605240 durante a infecção pelo ZIKV.

Em seguida, investigamos os efeitos do inibidor PI3Ky na infecção por ZIKV em células de neuroblastomas humanos da linhagem SH-SY5Y. Para isso, infectamos neuroblastomas humanos com MOI 1 por 1 hora, após a adsorção tratamos com inibidor AS605240 a cada 24 horas em concentrações de 0,5; 5; e 50  $\mu\text{M}$  durante 48 horas (Figura 21A). Após 48 horas, para avaliar a morte celular (LDH) e o título viral, coletamos o sobrenadante celular. Os resultados demonstram que o ZIKV aumenta significativamente a morte neuronal e o tratamento com o inibidor AS605240 foi capaz de reduzir a morte neuronal induzida pelo ZIKV, independente da dose administrada (Figura 21B). Também, demonstramos que o tratamento com AS605240 reduz mais de um Log na replicação viral (Figura 21C) quando comparado com o grupo infectado apenas pelo ZIKV.

Para confirmar a inibição da via de sinalização PI3Ky, quantificamos a expressão de pAKT após 48 horas de infecção pelo ZIKV com tratamento na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  AS605240. Embora o ZIKV tenha aumentado os níveis de pAKT em comparação ao grupo não infectado, o grupo infectado pelo ZIKV e tratado com AS605240 não apresentou esse aumento, demonstrando a eficácia do inibidor da via (Figura 21D-E). Novamente, nossos resultados demonstram que a inibição da via PI3Ky é benéfica para a infecção pelo ZIKV tanto em neurônios murinos quanto em células neurais humanas.



**Figura 21. Redução da morte neuronal e do título viral em neuroblastomas humanos (SH-SY5Y).**

Representação esquemática da estratégia experimental para avaliar os efeitos terapêuticos do inibidor PI3Ky AS605240 e a expressão de pAKT (A). SH-SY5Y foi infectado pelo ZIKV (moi 1), posteriormente foi tratado ou não com o inibidor AS605240 nas concentrações de 0,5; 5; e 50 µM. Após 48 horas, foram realizadas (B) análise de morte celular e (C) título viral em células de neuroblastoma. E para confirmar o efeito do inibidor AS605240, quantificamos a expressão de pAKT, neuroblastomas humanos foram infectados por ZIKV (moi 1) e posteriormente tratados com 0,5 µM AS605240. (D) As células foram utilizadas para quantificação de pAKT e (E) imagens representativas.

## 6.DISSCUSSÃO

Após surtos de Zika nas Américas, estudos demonstraram que o ZIKV é neurotrópico e desencadeia uma resposta inflamatória que compromete a integridade da Barreira Hematoencefálica (BHE), facilitando sua disseminação para outras células

do SNC, como neurônios, astrócitos e micróglia. Em resposta à infecção, as células liberam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Tal resposta do hospedeiro potencializa o sistema imunológico a combater a infecção. No entanto, esse processo desencadeia também um desequilíbrio na homeostase e contribui para a neuroinflamação (CLE et al., 2020). Como consequência da morte celular, a neuropatogênese induzida pelo ZIKV causa vários distúrbios cerebrais, como a microcefalia causada pelo desenvolvimento fetal durante a gravidez (MLAKAR et al., 2016). Portanto, é urgente compreender possíveis mecanismos celulares que o vírus possa utilizar para se beneficiar e desenvolver terapias.

No presente trabalho, investigamos o potencial efeito neuroprotetor da inibição da via PI3K $\gamma$  durante a infecção pelo ZIKV usando uma estratégia farmacológica (o inibidor AS605240) ou uma abordagem genética (camundongos deficientes PI3K $\gamma$  kd/kd), tanto em experimentos in vitro quanto in vivo. Nossos principais achados foram: (I) Redução na morte e no título viral em neurônios derivados de embriões deficientes para a enzima catalítica PI3K $\gamma$ <sup>kd/kd</sup>. (II) Redução dos títulos virais, lesão, ativação celular de células inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias liberadas por elas no cérebro de camundongos previamente tratados com inibidor AS605240 e infectados por ZIKV. (III) Redução dos títulos virais, lesão, ativação celular de células inflamatórias no cérebro de camundongos infectados pelo ZIKV e tratados terapeuticamente com inibidor AS605240. (IV) Redução na morte e no título viral em neuroblastomas humanos (SH-SY5Y) tratados com inibidor AS605240.

A via PI3K/Akt desempenha um papel crucial no controle de funções celulares essenciais, incluindo migração celular, sobrevivência, metabolismo e proliferação (HAWKINS et al., 2015; CANTLEY et al., 1999). A isoforma PI3K $\gamma$  é particularmente expressa em células leucocitárias, células endoteliais, células gliais e células neuronais (LANAHAN et al., 2022). Devido ao papel fundamental da PI3K $\gamma$  na migração leucocitária, esta via tornou-se alvo de estudos em doenças inflamatórias, sejam elas não infecciosas ou infecciosas.

Estudos anteriores destacaram a importância da via PI3K $\gamma$  em várias infecções virais (DUNN et al., 2012). Por exemplo, a via PI3K/AKT regula a replicação de vários vírus, incluindo vírus JEV e DEN-2 (LEE et al., 2005), vírus da hepatite B e C (SHIH et al., 2000; HE, Y et al., 2002), vírus Vaccinia e Cowpox (SOARES et al., 2009), vírus Usutu (USUV), vírus do Nilo Ocidental (WNV) (ALBENTOSA-GONZÁLEZ et al.,

2021), entre outros. Esses vírus impactam a via PI3K/AKT de diversas maneiras, como a entrada do vírus na célula, a tradução da proteína viral e principalmente a sobrevivência celular, pois esse mecanismo adia a apoptose da célula hospedeira e garante a persistência do vírus na infecção (DIEHL et al 2013). Quando investigamos a inibição seletiva de PI3K $\gamma$  com AS605240 em neuroblastomas humanos ou em neurônios primários derivados de embriões com PI3K $\gamma$ kd/kd, que são células extremamente importantes na infecção por ZIKV, observamos redução na replicação viral e mortalidade celular quando comparado ao grupo controle, apenas infectado com ZIKV. Essas descobertas corroboram um estudo anterior, onde os pesquisadores mostraram que o tratamento com o inibidor de quinase derivado do celecoxib AR-12 (OSU-03012) inibe o vírus Zika através da regulação negativa de PI3K/Akt em células neuronais (CHAN et al., 2018). Além disso, foi demonstrado que durante a infecção pelo ZIKV, a AKT da célula hospedeira interage com a proteína NS5 do vírus, contribuindo para a replicação viral. Estes resultados foram confirmados pelo tratamento com o inibidor específico de AKT, MK-2206, que reduziu a carga viral em células vero infectadas com ZIKV (ALBENTOSA-GONZÁLEZ et al., 2021).

Em seguida, investigamos os efeitos da inibição farmacológica do PI3K $\gamma$  na infecção pelo ZIKV em sistemas in vivo. Descobrimos que a inibição farmacológica da via PI3K $\gamma$  (AS605240), administrada tanto antes ou quanto após a infecção pelo ZIKV, foi capaz de reduzir a replicação viral no cérebro dos animais. Este resultado vai de encontro com a literatura existente, a qual sugere que a regulação negativa da AKT reduz a replicação do ZIKV no cérebro de camundongos A129 (CHAN et al., 2018).

Além disso, nossos resultados mostram que a inibição farmacológica da via PI3K $\gamma$  com o AS605240 também reduz as lesões cerebrais provocadas pelo vírus. Já foi demonstrado que o AS605240 é capaz de reduzir a fosforilação da AKT no cérebro dos camundongos (PASSOS et al., 2010; SHANG et al., 2019). Em outro contexto patológico, como em um modelo murino de acidente vascular cerebral (AVC), o AS605240, ao reduzir a fosforilação da AKT no cérebro dos camundongos, exerce um efeito protetor, melhorando a pontuação na função neurológica, diminuindo o tamanho do infarto e reduzindo a ativação dos astrócitos nos camundongos após a lesão (SHANG et al., 2019).

Posteriormente, investigamos algumas células-alvo do ZIKV que poderiam contribuir para o aumento da inflamação no cérebro, como micróglia e astrócitos (VEILLEUX et al., 2022; FOK-MOON et al., 2017). Nossos resultados confirmaram que

o ZIKV desencadeou um aumento no número de células positivas para IBA1 e S100b. A Microglia, quando ativada durante a infecção pelo ZIKV, produz altos níveis de fatores neurotóxicos e pró-inflamatórios associados à neuroinflamação, favorecendo a propagação do vírus no cérebro (FOK-MOON et al., 2017). Da mesma forma, os astrócitos, quando infectados, contribuem para a replicação viral, resultando em neuroinflamação e morte neuronal (VEILLEUX et al., 2022). É importante ressaltar que o tratamento com um inibidor PI3K $\gamma$  no grupo de camundongos infectados pelo ZIKV foi capaz de prevenir tanto o aumento de células positivas para IBA-1 quanto para S100b quando comparado ao grupo infectado apenas pelo ZIKV. Nossos resultados corroboram com estudos anteriores, visto que o inibidor seletivo de PI3K $\gamma$ , o AS605240, foi capaz de atenuar o acúmulo de astrócitos ativados e microglia no hipocampo em um modelo murino de Alzheimer (PASSOS et al., 2010). Sabe-se também que, frente a outros estímulos inflamatórios, a via PI3K/AKT desempenha um papel importante na microglia ativada, como na ativação de vias de resposta inflamatória dependentes de NF- $\kappa$ B (SAPONARO et al., 2012). Dessa mesma forma, estudos realizados por nosso grupo demonstraram que camundongos deficientes para PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma^{-/-}$ ) na infecção por malária apresentam redução de hemorragia, obstrução vascular e acúmulo de leucócitos, bem como menor ativação microglial (microglia reativa Iba-1 +) no cérebro desses animais (LACERDA-QUEIROZ et al., 2024). Também já foi descrito que existe uma correlação entre a regulação positiva da via PI3K/AKT e a reatividade dos astrócitos (CHENG et al., 2020; ZHANG et al., 2024). Esses astrócitos reativos exibiram níveis aumentados de PI3K, pAKT e AKT contra estímulos inflamatórios causados por LPS+IFN $\gamma$  (CHENG et al., 2020).

Embora tenhamos observado que a inibição da PI3K $\gamma$  previne o aumento de células inflamatórias no cérebro de camundongos A129, é interessante notar que não há diferença nos níveis de mediadores pró-inflamatórios ou quimiocinas entre os únicos grupos infectados e aqueles infectados e tratados com o inibidor por PI3K $\gamma$ . No nosso grupo, esse mesmo fenótipo foi detectado em outros contextos infecciosos. Por exemplo, embora a neurodegeneração induzida pelo ZIKV tenha sido prevenida pelo tratamento com memantina, a produção de mediadores inflamatórios e a perda de peso em camundongos IFN- $\alpha$  /  $\beta$ R  $-/-$  não foram afetadas (COSTA & DEL SARTO et al., 2017). Da mesma forma, um inibidor de triptofano também reduziu a microglia e os astrócitos, embora não tenha interferido nos títulos virais do ZIKV e na mediadores

inflamatórios (MARIM et al., 2021). Além desses mediadores, foi identificado um fator neurotrófico (BDNF), responsável por promover a sobrevivência, manutenção e reorganização do microambiente neuronal no SNC (LIMA et al., 2018). Curiosamente, nossos resultados demonstraram que os níveis de BDNF estão aumentados apenas no grupo infectado e tratado com AS605240. Esse aumento do BDNF no grupo tratado com AS605240 e infectado pelo ZIKV pode estar associado a mecanismos celulares para garantir a homeostase cerebral e o controle da infecção, visto que, o tratamento contribuiu para a redução das lesões e ativação celular. Considerando que a neuroinflamação é regulada por fatores que também estão envolvidos na modulação da expressão do BDNF e pacientes com distúrbios psiquiátricos e neurodegenerativos frequentemente apresentam concentrações reduzidas de BDNF no sangue e no cérebro (LIMA et al., 2018). Estudos anteriores com ZIKV demonstraram uma diminuição importante nos níveis de BDNF nas placentas de pacientes infectados pelo ZIKV, especialmente em grupos de bebês com microcefalia (RABELO et al., 2020).

Com intuito de investigar o perfil celular envolvido nas respostas inflamatórias e imunológicas desencadeadas no combate contra o ZIKV no SNC. Nossos resultados indicaram que a infecção pelo ZIKV em camundongos A129 causou aumento na ativação microglial, aumentou a produção do mediador pró-inflamatório TNF e, curiosamente, também aumentou a expressão do receptor CD206+ e a produção da citocina anti-inflamatória. IL-10 inflamatória. Esses achados sugerem a possibilidade de um controle da homeostase, uma vez que já foi demonstrado que a IL-10 tem a capacidade de modular a via PI3K na microglia, resultando na inibição da produção e liberação de TNF- $\alpha$  induzida pelo LPS (FOK-MOON et al., 2017). Quando avaliamos camundongos tratados com o inibidor AS605240, vimos que o AS605240 foi capaz de inibir o aumento da ativação microglial juntamente com a expressão de TNF, receptor CD206+ e IL-10, sugerindo que a inibição da PI3K $\gamma$  pode ser benéfica na infecção pelo ZIKV. Corroborando com nossos dados trabalhos anteriores descreveram a via PI3K/AKT é modulada pela microglia ativada, uma vez ativada essa via resulta no aumento da produção de fatores pró-inflamatórios, como o TNF, e na aquisição de um fenótipo neurotóxico (SAPONARO et al., 2012).

Sabe-se que a ativação de micróglia e astrócitos durante uma infecção viral contribui para o influxo de células efetoras TCD8 no SNC [37]. As Células T CD8+ em camundongos *lfnar1<sup>-/-</sup>* durante a infecção pelo ZIKV são responsáveis por prevenir a

replicação viral através de mecanismos indiretos, como a liberação de citocinas (BALINT et al.,2024). Embora as células T CD8 + tenham atividade antiviral no cérebro, limitando a infecção dos neurônios pelo ZIKV, sua atividade também contribui para a estimulação da paralisia associada ao ZIKV (BALINT et al.,2024). Ao analisar o grupo previamente tratado com o inibidor AS605240, observamos que o tratamento previne o aumento de células T CD8+ e, conseqüentemente, o aumento dos mediadores IFN- $\gamma$  e IL-17. Já foi descrito que na infecção por WNV ou ZIKV, o excesso dessas citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ , mediado por células T CD8+, pode danificar estruturas neuronais e promover a apoptose neuronal [37-39]. Além disso, também foi descrito que PI3K $\gamma$  desempenha um papel crucial na migração de células T CD8 efetoras para locais inflamatórios, demonstrando que células T CD8 efetoras deficientes em p110 $\gamma$  exibem migração prejudicada ou reduzida tanto in vitro quanto in vivo (MARTIN et al., 2008). Assim, nossos resultados sugerem que a inibição de PI3K $\gamma$  é importante para controlar a migração de células T CD8, o ambiente neurotóxico e a morte celular proporcionada pelas células T CD8 durante a infecção pelo ZIKV.

Estas descobertas fornecem evidências de que o inibidor AS605240 pode desempenhar um papel protetor significativo em ambientes in vitro e in vivo durante a infecção pelo ZIKV. Estas descobertas abrem novas perspectivas promissoras para o uso do inibidor AS605240 como estratégia terapêutica para combater o dano neuronal associado à infecção pelo ZIKV em ambientes clínicos.

## 7.CONCLUSÃO

Nossos achados demonstram que a inibição da PI3K $\gamma$  exerce um efeito neuroprotetor ao atenuar a replicação viral e os danos ao SNC associados à infecção pelo ZIKV. Este achados decorrem da redução dos títulos virais e da neuroinflamação associada a diminuição da ativação de células específicas, incluindo micróglia e células T CD8, levando a uma redução subsequente na liberação de mediadores pró-inflamatórios por essas células. Investigações adicionais são necessárias para elucidar completamente os mecanismos neuroprotetores e antivirais subjacentes à inibição da PI3K $\gamma$  . No entanto, nossos resultados implicam que a inibição da PI3K $\gamma$  é promissora como estratégia terapêutica para o tratamento da infecção pelo ZIKV.

## 8.REFERÊNCIAS

- AGRELLI, A. et al. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 69, p. 22–29, 2019.
- ALBENTOSA-GONZÁLEZ, L. et al. Akt Kinase Intervenes in Flavivirus Replication by Interacting with Viral Protein NS5. *Viruses*, v. 13, n. 5, p. 896, 2021. DOI: 10.3390/v13050896.
- AMARAL, D. C.; RACHID, M. A.; VILELA, M. C.; CAMPOS, R. D.; FERREIRA, G. P.; RODRIGUES, D. H.; LACERDA-QUEIROZ, N.; MIRANDA, A. S.; COSTA, V. V.; CAMPOS, M. A.; KROON, E. G.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L. Intracerebral infection with dengue-3 virus induces meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice. *Journal of Neuroinflammation*, v. 8, 9 mar. 2011. DOI: 10.1186/1742-2094-8-23. PMCID: PMC3061920.
- ANNAMALAI, A. S. et al. Zika Virus Encoding Nonglycosylated Envelope Protein Is Attenuated and Defective in Neuroinvasion. *Journal of Virology*, v. 91, n. 23, 1 dez. 2017.
- ANTONIV TT, Ivashkiv LB. Interleukin-10-induced gene expression and suppressive function are selectively modulated by the PI3K-Akt-GSK3 pathway. *Immunology*. 2011 Apr;132(4):567-77. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03402.x. Epub 2011 Jan 24. PMID: 21255011; PMCID: PMC3075510.
- AYTENFISU, T. Y.; CAMPBELL, H. M.; CHAKRABARTI, M.; AMZEL, L. M.; GABELLI, S. B. Class I PI3K Biology. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 436, p. 3-49, 2022. DOI: 10.1007/978-3-031-06566-8\_1.
- BACKER, J. M. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochemical Journal*, v. 410, n. 1, p. 1–17, 15 fev. 2008. DOI: 10.1042/BJ20071427.
- BARROWS, N. J. et al. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical Reviews*, v. 118, n. 8, p. 4448–4482, 25 abr. 2018.

BASARAB, M. et al. Zika virus. *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 352, p. i1049, 2016.

BYLER, Kendall G. et al. In-silico screening for anti-Zika virus phytochemicals. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, v. 69, p. 78-91, 2016. DOI: 10.1016/j.jmngm.2016.08.011.

CAMARGOS, V. N. et al. In-depth characterization of congenital Zika syndrome in immunocompetent mice: Antibody-dependent enhancement and an antiviral peptide therapy. *EBioMedicine*, v. 44, p. 516-529, jun. 2019. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.014.

CAMERON, B.; ZAHEER, S. A.; DOMINGUEZ-VILLAR, M. Control of CD4+ T Cell Differentiation and Function by PI3K Isoforms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 436, p. 197-216, 2022. DOI: 10.1007/978-3-031-06566-8\_8.

Camps, M., Rückle, T., Ji, H. et al. Blockade of PI3K $\gamma$  suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 11, 936–943 (2005). <https://doi.org/10.1038/nm1284>

CANTLEY, L.C.; NEEL, B.G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 96, p. 4240–4245, 1999.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet (London, England)*, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00562-6.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, 2014. DOI: 10.3201/eid2006.140138.

CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: A retrospective study. *The Lancet*, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 2016.

CHAN, J. F.-W. et al. The celecoxib derivative kinase inhibitor AR-12 (OSU-03012) inhibits Zika virus via down-regulation of the PI3K/Akt pathway and protects Zika virus-infected A129 mice: A host-targeting treatment strategy. *Antiviral Research*, v. 160, p. 38-47, 2018. DOI: 10.1016/j.antiviral.2018.10.007.

CHENG, Ying-Ying et al. Reactive astrocytes display pro-inflammatory adaptability with modulation of Notch-PI3K-AKT signaling pathway under inflammatory stimulation. *Neuroscience*, v. 440, p. 130-145, 2020. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.05.023.

*CHIMELLI, L. et al. The spectrum of neuropathological changes associated with congenital Zika virus infection. Acta Neuropathologica, v. 133, n. 6, p. 983-999, jun. 2017. doi: 10.1007/s00401-017-1699-5.*

CHOUIN-CARNEIROMOR, G. Placental Inflammatory Response to Zika Virus may Affect Fetal Brain Development. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 75, n. 4, p. 421–422, 2016.

CHU, J. J.; YANG, P. L. c-Src protein kinase inhibitors block assembly and maturation of dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 10, p. 3520–3525, 2007.

CLE, M.; DESMETZ, C.; BARTHELEMY, J.; MARTIN, M. F.; CONSTANT, O.; MAARIFI, G.; et al. Zika virus infection promotes local inflammation, upregulation of adhesion molecules, and leukocyte recruitment at the blood-brain barrier. *mBio*, v. 11, n. 4, p. e01183-20, 2020. DOI: 10.1128/mBio.01183-20.

COORAY, S. The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase–Akt signal transduction in virus survival. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 1065–1076, 2004.

COSTA, C. et al. Phosphoinositide 3-Kinase p110c in Immunity. *Life*, v. 63, n. 9, p. 707–713, 2011.

COSTA, V. V. et al. N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor Blockade Prevents Neuronal Death Induced by Zika Virus Infection. *mBio*, v. 8, n. 2, p. e02221-16, 27 abr.

2017. DOI: 10.1128/mBio.02221-16.

COULOMBIER, D. et al. Rapid risk assessment: Microcephaly in Brazil potentially linked to the Zika virus epidemic.

CULSHAW, A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. The immunology of Zika Virus. *F1000Research*, v. 7, n. 0, p. 203, 2018.

CULSHAW, A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. The immunology of Zika Virus. *F1000Research*, v. 7, n. 0, p. 203, 2018. DOI: 10.12688/f1000research.13684.1.

DE OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Congenital Zika virus infection: Beyond neonatal microcephaly. *JAMA Neurology*, v. 73, n. 12, p. 1407–1416, 2016. DOI: 10.1001/jamaneurol.2016.3599.

DEJNIRATTISAI, W. et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nature Immunology*, v. 16, n. 2, p. 170-177, fev. 2015. doi: 10.1038/ni.3058.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nature Immunology*, v. 17, n. 9, p. 1102-1108, set. 2016. doi: 10.1038/ni.3515.

DICK, G. W.; COZINHA, S. F.; HADDOW, A. J. Vírus Zika. I. Isolamentos e especificidade serológica. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952. DOI: 10.1016/0035-9203(52)90042-4.

DIEHL, N.; SCHAAL, N. Make Yourself at Home: Viral Hijacking of the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Viruses*, v. 5, p. 3192–3212, 2013. DOI: 10.3390/v5123192.

DIALLO, D. et al. Zika Virus Emergence in Mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, p. e109442, 13 out. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0109442.

DUBANKOVA, A.; BOURA, E. Structure of the yellow fever NS5 protein reveals

conserved drug targets shared among flaviviruses. *Antiviral Research*, v. 169, 2019.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 24, p. 2536-43, 2009. DOI: 10.1056/NEJMoa0805715.

DUNN, E. F.; CONNOR, J. H. HijAkt: The PI3K/Akt pathway in virus replication and pathogenesis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, v. 106, p. 223-250, 2012. DOI: 10.1016/B978-0-12-396456-4.00002-X. PMID: 22340720; PMCID: PMC7149925.

EHRHARDT, C.; LUDWIG, S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cellular Microbiology*, v. 6, p. 863–87, 2009. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01356.x.

ELLUL, M.; SOARES, C.; SOLOMON, T. Zika virus and Guillain-Barré syndrome. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, v. 46, n. 2, p. 103–105, 2016.

FALASCA, M. et al. Class II phosphoinositide 3-kinases as novel drug targets. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 60, p. 47–65, 2017. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00968.

FEITOSA, I. M. L. et al. Aspectos importantes da Síndrome da Zika Congênita para o pediatra e o neonatologista. *Boletim Científico de Pediatria*, v. 5, n. 3, p. 1–9, 2016.

FERREIRA, Lydia Masako et al. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 20, supl. 2, p. 28-34, 2005. DOI: 10.1590/S0102-86502005000800008.

Fok-Moon Lum, Donovan K. S. Low, Yiping Fan, Jeslin J. L. Tan, Bennett Lee, Jerry K. Y. Chan, Laurent Rénia, Florent Ginhoux, Lisa F. P. Ng, Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces Inflammation, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 64, Issue 7, 1 April 2017, Pages 914–920, <https://doi.org/10.1093/cid/ciw878>

FOUREAUX G et al. Ocular Inserts for Sustained Release of the Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activator, Diminazene Aceturate, to Treat Glaucoma in Rats. *PloS One* (2015) 10(7):e0133149.

FOURIE, T. et al. Variability of zika virus incubation period in humans. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 5, n. 11, 2018.

FRUMAN, D. A. et al. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, v. 170, n. 4, p. 605-635, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.07.028.

FRUMAN, D. A. et al. Phosphoinositide kinases. *Annual Review of Biochemistry*, v. 67, p. 481–507, 1998.

GARBER, C. et al. T cells promote microglia-mediated synaptic elimination and cognitive dysfunction during recovery from neuropathogenic flaviviruses. *Nature Neuroscience*, v. 22, n. 8, p. 1276-1288, ago. 2019. DOI: 10.1038/s41593-019-0427-y. PMID: 31235930; PMCID: PMC6822175.

GHIGO, A.; DAMILANO, F.; BRACCINI, L.; HIRSCH, E. PI3K inhibition in inflammation: toward tailored therapies for specific diseases. *BioEssays*, v. 32, p. 185–196, 2010.

GREGORY, C. J. et al. Modes of Transmission of Zika Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. suppl\_10, p. S875–S883, 16 dez. 2017. DOI: 10.1093/infdis/jix434.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY,

P. M. (Eds.). *Fields Virology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1155–1227.

GUEDES, D. R. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerging Microbes & Infections*, v. 6, n. 8, p. e69, 9 ago. 2017. DOI: 10.1038/emi.2017.58.

GUO, M. et al. ZIKV viral proteins and their roles in virus-host interactions. *Science China Life Sciences*, v. 64, n. 5, p. 709-719, 2021. DOI: 10.1007/s11427-020-1818-4.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology*, v. 89, n. 17, p. 8880-96, 2015. DOI: 10.1128/JVI.00354-15.

HAWKINS, P. T.; STEPHENS, L. R. PI3K signalling in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1851, n. 6, p. 882–897, jun. 2015. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.01.003.

HE, Y.; NAKAO, H.; TAN, S. L.; POLYAK, S. J.; NEDDERMANN, P.; VIJAYSRI, S.; JACOBS, B. L.; KATZE, M. G. Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural protein 5A through interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Virology*, v. 76, p. 9207-9217, 2002.

HILLS, Susan L. et al. Epidemiology of Zika Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, suppl. 10, p. S868-S874, 2017. DOI: 10.1093/infdis/jix434.

HU, H. et al. Targeting Type I Interferon Induction and Signaling: How Zika Virus Escapes from Host Innate Immunity. *International Journal of Biological Sciences*, v. 19, n. 10, p. 3015-3028, 2023. DOI: 10.7150/ijbs.83056.

JACKMAN, J. A. et al. Therapeutic treatment of Zika virus infection using a brainpenetrating antiviral peptide. *Nature Materials*, p. 1, 2018.

JIMÉNEZ DE OYA, N. et al. Direct Activation of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) by PF-06409577 Inhibits Flavivirus Infection through Modification of Host Cell Lipid Metabolism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

v. 62, n. 7, p. e00360-18, 26 jun. 2018. DOI: 10.1128/AAC.00360-18.

KANDIA, R. et al. Modulation of Dengue/Zika Virus pathogenicity by antibody-dependent enhancement and strategies to protect against enhancement in Zika Virus infection. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 455, 23 abr. 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00455.

KREUTZFELDT, M. et al. Neuroprotective intervention by interferon- $\gamma$  blockade prevents CD8+ T cell-mediated dendrite and synapse loss. *Journal of Experimental Medicine*, v. 210, n. 10, p. 2087-2103, 2013. DOI: 10.1084/jem.20122143. PMID: 23999498; PMCID: PMC3782053.

KHANDIA, R. et al. Modulation of Dengue/Zika Virus pathogenicity by antibody-dependent enhancement and strategies to protect against enhancement in Zika Virus infection. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 455, 23 abr. 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00455.

KURSCHEIDT, F. A. et al. Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. *Nature Reviews Urology*, v. 16, n. 4, p. 211–230, 2019.

LACERDA-QUEIROZ, N. et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase  $\gamma$  is required for the development of experimental cerebral malaria. *PLOS ONE*, v. 10, n. 3, p. e0119633, mar. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0119633. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119633>. Acesso em: 7 ago. 2024.

LADYGINA, N. et al. PI3K $\gamma$  kinase activity is required for optimal T-cell activation and differentiation. *European Journal of Immunology*, v. 3, n. 12, p. 3183–3196, 2013.

LANAHAN, S. M.; WYMAN, M. P.; LUCAS, C. L. The role of PI3K $\gamma$  in the immune system: new insights and translational implications. *Nature Reviews Immunology*, v. 22, n. 11, p. 687-700, 2022. DOI: 10.1038/s41577-022-00701-8.

LANGERAK, T. et al. The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. *PLoS Pathogens*, v. 15, n. 4, p. e1007640, 2019.

- LAU, J. T. F. et al. Seroprevalence of Zika Virus Infection in Hong Kong. *PLoS ONE*, v. 13, n. 10, p. e0206311, 10 out. 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0206311.
- LEE, Chyan-Jang et al. Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. *Journal of Virology*, v. 79, n. 13, p. 8388-8399, 2005. DOI: 10.1128/JVI.79.13.8388-8399.2005.
- LEDERMANN, J. P. et al. *Aedes hensilli* as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 10, p. e3188, 2014.
- LI, C. et al. Chloroquine, a FDA-approved Drug, Prevents Zika Virus Infection and its Associated Congenital Microcephaly in Mice. *EBioMedicine*, v. 24, p. 189–194, 2017.
- LI, G. et al. The roles of prM-E proteins in historic and epidemic Zika virus-mediated infection and neurocytotoxicity. *Virus*, v. 11, n. 157, 2019.
- LIANG, Q. et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell*, v. 19, n. 5, p. 663-671, 2016. DOI: 10.1016/j.stem.2016.07.019.
- LIMA G B. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol Neurobiol*. 2019 May;56(5):3295-3312. doi: 10.1007/s12035-018-1283-6. Epub 2018 Aug 17. PMID: 30117106; PMCID: PMC6476855.
- LINDENBACH, B. D. et al. Flaviviridae. In: *Fields Virology*. 6. ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 712–716.
- LINERO, F. N.; SCOLARO, L. A. Participation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in Junin virus replication in vitro. *Virus Research*, v. 145, n. 1, p. 166-170, 2009.
- LIU, Y. et al. Dengue virus subgenomic RNA induces apoptosis through the Bcl-2-mediated PI3k/Akt signaling pathway. *Virology*, v. 448, p. 15–25, 2014.

LOWE, Rachel et al. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, n. 1, p. 96, 2018. DOI: 10.3390/ijerph15010096.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 48, n. 2, p. 139-145, 1954. DOI: 10.1016/0035-9203(54)90006-1.

MARIM, F. M.; TEIXEIRA, D. C.; et al. Inhibition of Tryptophan Catabolism Is Associated With Neuroprotection During Zika Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, v. 12, 15 jul. 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.702048. PMCID: PMC8320694.

MARRA, R. et al. Zika Virus and the Host Innate Immune Response: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 466, 23 jun. 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00466.

Martin, A. L., Schwartz, M. D., Jameson, S. C., & Shimizu, Y. (2008). Selective regulation of CD8 effector T cell migration by the p110 $\gamma$  isoform of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Immunology*, 180(4), 2081–2088. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2081

MELLO, C. et al. Zika virus-induced neuroinflammation and neurodegeneration: The role of astrocytes and microglia. *Journal of Neuroinflammation*, v. 14, n. 1, p. 99, 7 jun. 2017. DOI: 10.1186/s12974-017-0868-6.

MEERTENS, L. et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Reports*, v. 18, n. 2, p. 324–333, 2017.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE. Protocolo de Vigilância e Resposta À Microcefalia Relacionada À Infecção Pelo Vírus Zika. Versão 1.2 - 09/12/2015, p. 70, 2015.

Ministério da Saúde. Série Histórica Casos Prováveis de Zika 2015-2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/z/zika-virus/situacao-epidemiologica/serie-historica-casos-provaveis-de-zika-2015-2023/view>. Acesso em: 07 ago. 2024.

MIRANDA-FILHO, D. de B. et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. *American Journal of Public Health*, v. 106, n. 4, p. 598-600, 2016. DOI: 10.2105/AJPH.2016.303115.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016.

MONAGHAN, A. J. et al. On the Seasonal Occurrence and Abundance of the Zika Virus Vector Mosquito *Aedes Aegypti* in the Contiguous United States. *PLoS Currents*, v. 8, 2016.

MOUTON, S. et al. Protective immunity in Zika virus infection and disease. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 787, 30 mar. 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.661043.

MUSSO, D. et al. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 10, p. O595-596, 2014. DOI: 10.1111/1469-0691.12707.

MUSSO, D. et al. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *The Lancet*, v. 386, n. 9990, p. 243-244, 2015. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)61273-9.

MUSSO, Didier; GUBLER, Duane J. Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016. DOI: 10.1128/CMR.00072-15.

MUSSO, Didier; YSÉN, C.; FALCHI, A. Zika Virus Infection: Update on the Role of Clinical Microbiology in Diagnosis and Management. *Current Clinical Microbiology Reports*, v. 2, n. 4, p. 151-157, 2015.

NAIR, V. et al. Zika Virus and Its Associated Neurological Complications. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 636953, 16 mar. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.636953.

NAGARAJAN, M. et al. Emerging Zika Virus Infections: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Journal of Clinical Virology*, v. 125, p. 104348, 30 jun. 2020. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104348.

NGUYEN, T. T. N. et al. Zika Virus Proteins NS2A and NS4A Are Major Antagonists that Reduce IFN- $\beta$  Promoter Activity Induced by the MDA5/RIG-I Signaling Pathway. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 10, p. 1665–1674, 2019.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological update. Neurological syndrome, congenital anomalies, and Zika virus infection. 17 January 2016. World Health Organization, 2016.

PAPA, M. P. et al. Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 2557, 22 dez. 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02557. PMID: 29312238; PMCID: PMC5743735.

PASSOS, G. F.; FIGUEIREDO, C. P.; PREDIGER, R. D. S.; SILVA, K. A. B. S.; SIQUEIRA, J. M.; DUARTE, F. S.; LEAL, P. C.; MEDEIROS, R.; CALIXTO, J. B. Involvement of phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by  $\beta$ -amyloid 1–40 peptide in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 24, n. 3, p. 493-501, 2010. ISSN 0889-1591. DOI: 10.1016/j.bbi.2009.12.003.

PERSAUD, M. et al. Infection by Zika viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. *Virology*, v. 518, p. 301–312, 2018.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 2016.

PETERSEN, L. R.; BUSCH, M. P. Transfusion-transmitted arboviruses. *Vox Sanguinis*, v. 98, n. 4, p. 495–503, 2010.

PINHO, V.; RUSSO, R. C.; AMARAL, F. A. et al. Tissue- and stimulus-dependent role

of phosphatidylinositol 3-kinase isoforms for neutrophil recruitment induced by chemoattractants in vivo. *Journal of Immunology*, v. 179, n. 11, p. 7891-7898, 1 dez. 2007. doi: 10.4049/jimmunol.179.11.7891.

.PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A Literature Review of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*, v. 22, n. 7, p. 1185-1192, 2016. DOI: 10.3201/eid2207.151990.

POSOR, Y. et al. Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature*, v. 499, n. 7457, p. 233-237, 2013. DOI: 10.1038/nature12360.

QADIR, A. et al. Potential targets for therapeutic intervention and structure based vaccine design against Zika virus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 156, p. 444–460, 2018.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. The role of glial cells in Zika virus-induced neurodegeneration. *Glia*, 2023.

RABELO, K. et al. Zika induces human placental damage and inflammation. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 2146, 1 set. 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02146. PMID: 32983175; PMCID: PMC7490298.

RASMUSSEN, S. A. et al. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 20, p. 1981–1987, 2016.

RICHARD, V.; PAOAAFAITE, T.; CAO-LORMEAU, V.-M. Vector Competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 9, p. e0005024, 2016.

RIVERA, M. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women and Neonates. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, v. 38, n. 10, p. 887–895, 2016. DOI: 10.1016/j.jogc.2016.06.015.

ROLFE, A. J. et al. Bioinformatic analysis reveals the expression of unique transcriptomic signatures in Zika virus infected human neural stem cells. *Cell &*

Bioscience, v. 6, p. 42, 2016. DOI: 10.1186/s13578-016-0110-x.

RUCKLE, T. et al. PI3Kgamma inhibition: towards an —aspirin of the 21st centuryll? Nature Reviews Drug Discovery, v. 5, p. 903–918, 2006.

RUTVISUTTINUNT, W. et al. Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012–2014. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 93, n. 2, p. 380-383, 2015.

SHAN, C.; XIE, X.; KROSCHEWSKI, H. Zika virus protein E mutation V473M enhances neurovirulence and vertical transmission in a mouse model. Journal of Virology, v. 90, n. 23, p. 10812-10823, 2016. DOI: 10.1128/JVI.01829-16.

SAPONARO, C. et al. The PI3K/Akt pathway is required for LPS activation of microglial cells. Immunopharmacology and Immunotoxicology, v. 34, n. 5, p. 858-865, out. 2012. DOI: 10.3109/08923973.2012.665461. Epub 8 mar. 2012. PMID: 22397361.

SARIOL, Carlos A.; NOGUEIRA, Maria L.; VASILAKIS, Nicholas. A tale of two viruses: does heterologous flavivirus immunity enhance Zika disease? Trends in Microbiology, v. 26, n. 3, p. 186-190, mar. 2018. doi: 10.1016/j.tim.2017.10.004.

SASAKI, T. et al. Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. Progress in Lipid Research, v. 48, p. 307–343, 2009.

SATCHIDANANDAM, V. Role of CD8+ T cells in immunity against flaviviruses. Critical Reviews in Immunology, v. 41, n. 3, p. 1-14, 2021. DOI: 10.1615/CritRevImmunol.2021039948. PMID: 35378007.

SHANG, S. et al. Inhibition of PI3K $\gamma$  by AS605240 Protects tMCAO Mice by Attenuating Pro-Inflammatory Signaling and Cytokine Release in Reactive Astrocytes. Neuroscience, v. 415, p. 107-120, 2019.

SHIH, W. L.; KUO, M. L.; CHUANG, S. E.; CHENG, A. L.; DOONG, S. L. The hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Journal of Biological

Chemistry, v. 275, p. 25858-25864, 2000.

SHIMONI, M. et al. Flavivirus infection of dendritic cells: the impact on innate immune response and viral pathogenesis. *Cellular Microbiology*, v. 17, n. 3, p. 332–341, mar. 2015. DOI: 10.1111/cmi.12362.

SMIRNOVA, N. F. et al. Targeting PI3K  $\gamma$  activity decreases vascular trauma-induced intimal hyperplasia through modulation of the Th1 response. *Journal of Experimental Medicine*, v. 211, p. 1779–1792, 2014.

SOARES, J. A.; LEITE, F. G.; ANDRADE, L. G.; TORRES, A. A.; DE SOUSA, L. P.; BARCELOS, L. S.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, P. C.; KROON, E. G.; SOUTO-PADRÓN, T.; BONJARDIM, C. A. Activation of the PI3K/Akt pathway early during vaccinia and cowpox virus infections is required for both host survival and viral replication. *Journal of Virology*, v. 83, n. 13, p. 6883-6899, Jul. 2009. DOI: 10.1128/JVI.00245-09. Epub 2009 Apr 22. PMID: 19386722; PMCID: PMC2698574.

STOLL, H. et al. Zika Virus–Related Central Nervous System Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 9, p. 3236, 3 set. 2020. DOI: 10.3390/ijms21093236.

TAM, A. et al. The PI3K/Akt Pathway in Flavivirus Replication. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 189, 4 mai. 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00189.

Tham, H. W., Balasubramaniam, V., Ooi, M. K., & Chew, M. F. (2018). Viral Determinants and Vector Competence of Zika Virus Transmission. *Frontiers in microbiology*, 9, 1040. doi.org/10.3389/fmicb.2018.01040.

TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 205, p. 269–273, 2016. DOI: 10.1007/s00430-015-0445-7.

- UTKARSH, B.; NEHA, P.; MEGHANA, R.; SUNIT, K. S. Gist of Zika Virus pathogenesis. *Virology*, v. 560, p. 86-95, 2021. DOI: 10.1016/j.virol.2021.04.008.
- VEILLEUX, C.; EUGENIN, E. A. Mechanisms of Zika astrocyte infection and neuronal toxicity. *NeuroImmune Pharmacology and Therapeutics*, v. 2, n. 1, p. 5-18, 25 mar. 2023. DOI: 10.1515/nipt-2022-0014. Epub 21 out. 2022. PMID: 37027343; PMCID: PMC10070016.
- WANG, J. et al. Immune Response and Pathogenesis of Zika Virus. *Trends in Microbiology*, v. 26, n. 4, p. 290–304, abr. 2018. DOI: 10.1016/j.tim.2017.12.003.
- WAY, E. E. et al. Dose-dependent suppression of cytokine production from T cells by a novel phosphoinositide 3-kinase delta inhibitor. *Scientific Reports*, v. 6, p. 30384, 2016.
- WILLISON, H. J.; JACOBS, B. C.; VAN DOORN, P. A. Guillain-Barré syndrome. *The Lancet*, v. 388, n. 10045, p. 717–727, 2016.
- YANG, X. et al. Mechanism of ATP hydrolysis by the Zika virus helicase. *The FASEB Journal*, v. 32, n. 10, p. 5250–5257, 2018.
- Z Aidan et al. “Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of monocytes/macrophages with a regulatory phenotype to perform phagocytosis and efferocytosis.” *JCI insight* vol. 7,1 e147819. 11 Jan. (2022).
- ZHANG, Q. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women: Current Understanding and Future Directions. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 2364, 12 nov. 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02364.
- ZHANG, X. et al. Zika virus NS2A-mediated virion assembly. *mBio*, v. 10, n. 5, 2019.

ZHANG, Z. et al. Crystal structure of unlinked NS2B-NS3 protease from Zika virus. *Science*, v. 354, n. 6319, p. 1597–1600, 2016.

ZHANG, S. et al. Enhanced VEGF secretion and blood-brain barrier disruption: Radiation-mediated inhibition of astrocyte autophagy via PI3K-AKT pathway activation. *Glia*, v. 72, n. 3, p. 568-587, mar. 2024. DOI: 10.1002/glia.24491. Epub em 27 nov. 2023. PMID: 38009296.