



PgPNSB

Pós-Graduação em
Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos

DANIEL WILSON ARRUDA MAGALHÃES

Efeito imunomodulador da ouabaína em células de neuroblastoma humano infectadas pelo zika virus

JOÃO PESSOA-PB
2024

DANIEL WILSON ARRUDA MAGALHÃES

Efeito imunomodulador da ouabaína em células de neuroblastoma humano infectadas pelo zika virus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. **Área de concentração: Farmacologia**

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Coorientadora: Profa. Dra. Naiara Naiana Dejadi

Ficha catalográfica

Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

M188e Magalhães, Daniel Wilson Arruda.

Efeito imunomodulador da ouabaína em células de neuroblastoma humano infectadas pelo zika virus / Daniel Wilson Arruda Magalhães. - João Pessoa, 2024.
76 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.

Coorientação: Naiara Naiana Dejani.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Arbovírus. 2. ZIKV. 3. Esteroides cardiotônicos.
4. Inflamação. 5. Resposta imune. I. Mascarenhas,
Sandra Rodrigues. II. Dejani, Naiara Naiana. III.
Título.

UFPB/BC

CDU 614(043)



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 497ª (quadringentesima nonagésima sétima) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Daniel Wilson Arruda Magalhães**, candidato(a) ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às nove horas e trinta minutos (09h30) do dia trinta de agosto do ano de dois mil e vinte e quatro (30/08/2024), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/utq-fqix-jui>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Daniel Wilson Arruda Magalhães**, candidato(a) ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Valnês da Silva Rodrigues Junior, Ph.D em Farmacologia Bioquímica e Molecular, Tatjana Keesen de Souza Lima, Ph.D em Bioquímica e Imunologia, e Sandra Rodrigues Mascarenhas, Ph.D em Fisiologia. Sendo todos integrante do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Sandra Rodrigues Mascarenhas, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Daniel Wilson Arruda Magalhães**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “**Efeito imunomodulador da ouabaína em células de neuroblastoma humano infectadas pelo ZIKV**”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO(A). Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente achar-se o(a) examinado(a) **Daniel Wilson Arruda Magalhães** legalmente habilitado(a) a receber o Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof.^a Dr.^a Sandra Rodrigues Mascarenhas (Orientadora)

Documento assinado digitalmente
gov.br SANDRA RODRIGUES MASCARENHAS
Data: 30/08/2024 12:05:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior (Examinador)

Documento assinado digitalmente
gov.br VALNES DA SILVA RODRIGUES JUNIOR
Data: 30/08/2024 11:15:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Tatjana K **gov.br** TATJANA KEESEN DE SOUZA LIMA CLEMENTE
Data: 30/08/2024 11:07:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br> adora)

Daniel Wilson Arruda Magalhães (Discente)

Documento assinado digitalmente
gov.br DANIEL WILSON ARRUDA MAGALHAES
Data: 30/08/2024 12:26:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



AGRADECIMENTOS

Aqui coloco todo o lirismo (na medida do possível), que para o bem da escrita científica não utilizei durante a confecção dessa dissertação, pois não haveria outra forma de descrever a gratidão pelas pessoas que em minha vida passaram e contribuíram na formação de minha bagagem emocional e científica.

Agradeço a minha mãe, pelo amor que nunca me faltou, pelo cuidado sem medidas e os ensinamentos que me foram passados durante toda minha vida e que continuam moldando meu ser até os dias de hoje. Como já disse em outros momentos, a faísca do questionamento foi você que me deu. Até hoje o fogo encontra-se aceso.

Agradeço ao meu pai por ser meu concreto. Mesmo diante de tantas dúvidas e do caos que permeia meus pensamentos, você foi minha amálgama e me manteve resiliente, para que enfrentasse os problemas da vida. Quando o caminho não parecia fazer sentido, você veio e me mostrou que eu nem ao menos precisava caminhar, pois já estava em meu destino.

Agradeço a minha irmã, minha maior inspiração na vida. Me sinto a pessoa mais sortuda da existência por ter a oportunidade de dividir esta vida sendo seu irmão. Se eu estou aqui hoje foi porque você me mostrou exatamente quem eu queria ser, como pessoa e profissional.

Agradeço a você meu irmão, nunca deixarei de agradecer. Não preciso de espiritualidade para sentir você junto de mim a todo momento.

Agradeço ao meu parceiro de vida, que esteve comigo todos os dias de minha vida desde que o conheci. As conversas, os cafés e o amor foram essenciais para a realização deste trabalho. Não sei quem sou sem você e gostaria de nunca saber.

A minha família, agradeço por todo suporte e amor que sempre me foi dado, sem vocês jamais estaria aqui.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas, por toda compreensão, conselhos, suporte, disponibilidade e humor. Se a ciência possuísse mais mentes como a sua, todos os problemas da humanidade já estariam resolvidos. Quando achei que tudo iria dar errado, você fez dar certo e me ensinou o verdadeiro significado de ser cientista.

Agradeço a minha coorientadora Profa. Dra. Naiara Naiana Dejani, por ter aceitado fazer parte deste projeto e compartilhado conosco seu conhecimento avassalador.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Imunobiotecnologia, que colaboraram com a execução deste trabalho. Deyse, Davi, Marreiro, Anna, Marianna, Noêmia, Bernardo e Gabi, saibam que sem o apoio e a amizade de vocês, esse trabalho não teria sido realizado. Ciência é uma atividade de colaboração e vocês compõem o melhor grupo que poderia existir.

Agradeço aos meus amigos, por estarem juntos comigo em todos os momentos, compartilhando risadas e conselhos e tornando minha jornada muito mais agradável.

Agradeço aos professores que compõem a Banca examinadora por terem se disponibilizado a me ajudar a trazer esse trabalho para sua melhor versão.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, pela vastidão dos conhecimentos compartilhados que permitiram meu aperfeiçoamento como profissional

Agradeço aos funcionários da UFPB, por todo trabalho e zelo que permitiram a realização desse trabalho nas melhores condições possíveis.

Agradeço as agências de fomento pelo suporte financeiro necessário. Agradecimentos especiais para a **Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ)**

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para este trabalho e não foram citados.

RESUMO

A ouabaína (OUA) faz parte da família dos esteroides cardiotônicos e classicamente atua como inibidor da Na⁺/K⁺-ATPase. Atualmente sua atividade imunomoduladora e antiviral já foi relatada em diversos estudos. O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus capaz de ocasionar distúrbios neurológicos, sendo que, a resposta inflamatória desregulada desempenha um papel importante durante a patogênese neural do vírus Zika (ZIKV). Atualmente, não existem vacinas ou antivirais disponíveis para tratar a doença causada pelo ZIKV. Dessa forma, diante das potencialidades da OUA, esse trabalho teve como objetivo avaliar sua atividade antiviral e anti-inflamatória contra o ZIKV, utilizando linhagem celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Inicialmente, as células SH-SY5Y foram tratadas com diferentes concentrações de OUA para avaliar a citotoxicidade da substância. Em seguida, após 1 hora de infecção pelo ZIKV (multiplicidade de infecção: 0.1), as células SH-SY5Y foram tratadas com OUA (18 nM) e as concentrações de citocinas pró-inflamatórias foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) e o título de ZIKV foi analisado pelo ensaio TCID₅₀. Também foi avaliado por ELISA a produção das citocinas no sobrenadante de cocultura entre células SH-SY5Y infectadas com ZIKV e macrófagos humanos. OUA reduziu significativamente a liberação de interleucina (IL)-6 induzida pelo ZIKV (em 25%), do fator de necrose tumoral (TNF)- α (em 50%) e o título de ZIKV (99,9%). Na cocultura o tratamento com OUA das SH-SY5Y infectadas com ZIKV reduziu expressivamente a produção de IL-1beta pela cocultura. Além disso, as vias de sinalização intracelular foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a redução de IL-6 e TNF- α foi acompanhada pela supressão de NF- κ B (em 75%), demonstrando a atividade anti-inflamatória da OUA durante infecção pelo ZIKV. Em adição, o tratamento com OUA foi capaz de restaurar a homeostase da fosforilação de mTOR, ERK e p38, destacando o potencial desta molécula na prevenção de danos à neurogênese causados pelo ZIKV. Em conjunto, esses dados evidenciam pela primeira vez a atividade anti-ZIKV e anti-inflamatória da OUA contra a infecção por ZIKV em linhagem de neuroblastoma humano. Além disso, este estudo contribui para confirmar a eficácia de esteroides cardiotônicos como potenciais agentes antivirais e imunomoduladores, tornando a OUA uma candidata promissora contra o ZIKV.

Palavras-Chave: Arbovírus. ZIKV. Esteroides cardiotônicos. Inflamação. Resposta imune.

ABSTRACT

Ouabain (OUA) is part of the cardiotonic steroid family and classically acts as an inhibitor of Na⁺/K⁺-ATPase. Currently, its immunomodulatory and antiviral activity has been reported in several studies. The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus capable of causing neurological disorders; in this context, the dysregulated inflammatory response plays an important role during the neural pathogenesis of the Zika virus (ZIKV). Currently, there are no vaccines or antivirals available to treat the disease caused by ZIKV. Therefore, given the potential of OUA, this study aimed to evaluate its antiviral and anti-inflammatory activity against ZIKV using a human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y). Initially, SH-SY5Y cells were treated with different concentrations of OUA to evaluate the cytotoxicity of the substance. Then, after 1 hour of ZIKV infection (multiplicity of infection: 0.1), SH-SY5Y cells were treated with OUA (18 nM), and the concentrations of pro-inflammatory cytokines were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the ZIKV titer was analyzed by TCID₅₀ assay. The production of cytokines in the supernatant of the co-culture between ZIKV-infected SH-SY5Y cells and human macrophages was also evaluated by ELISA. OUA significantly reduced ZIKV-induced interleukin (IL)-6 release (by 25%), tumor necrosis factor (TNF)- α (by 50%), and ZIKV titer (99.9%). In the co-culture, treatment with OUA of ZIKV-infected SH-SY5Y cells significantly reduced IL-1 β production by the co-culture. Additionally, intracellular signaling pathways were evaluated by flow cytometry. The results showed that the reduction of IL-6 and TNF- α was accompanied by NF- κ B suppression (by 75%), demonstrating the anti-inflammatory activity of OUA during ZIKV infection. In addition, OUA treatment was able to restore the homeostasis of mTOR, ERK, and p38 phosphorylation, highlighting the potential of this molecule in preventing neurogenesis damage caused by ZIKV. Taken together, these data provide the first evidence of the anti-ZIKV and anti-inflammatory activity of OUA against ZIKV infection in a human neuroblastoma cell line. Moreover, this study helps confirm the efficacy of cardiotonic steroids as potential antiviral and immunomodulatory agents, making OUA a promising candidate against ZIKV.

Keywords: Arbovirus. ZIKV. Cardiotonic steroids. Inflammation. Immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da ouabaína.....	14
Figura 2 – Atividade antiviral da ouabaína	20
Figura 3 – Estrutura do ZIKV e seu genoma	23
Figura 4 – Resposta antiviral inata mediante infecção pelo ZIKV	29
Figura 5 – As consequências da infecção pelo ZIKV de tecido neural imaturo	33
Figura 6 - Viabilidade de células SH-SY5Y tratadas com ouabaína.....	42
Figura 7 - Efeito da ouabaína no título viral do ZIKV.....	43
Figura 8 - Efeito da ouabaína na produção de citocinas pelas células SH-SY5Y infectadas com ZIKV	45
Figura 9 – Dosagem de citocinas no sobrenadante da cocultura (SH-SY5Y + macrófagos humanos).....	47
Figura 10 - Efeito da ouabaína nos níveis de fosforilação de proteínas intracelulares em células SH-SY5Y durante infecção pelo ZIKV.....	49
Figura 11 - Atividade antiviral e anti-inflamatória da ouabaína contra o ZIKV	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AKT	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
C	Capsídeo
CHIKV	Vírus Chikungunya
CPE	Efeito citopático
CC₅₀	Concentração que causa 50% de citotoxicidade
CC₂₀	Concentração que causa 20% de citotoxicidade
CoV	Coronavírus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
DMEM	Do inglês <i>"Dulbecco's Modified Eagle Medium"</i>
d.p.m.	Desvio padrão da média
E	Proteína E
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
HCMV	Citomegalovírus
Hpi	Horas após a infecção
IAV	Influenza vírus A
IC₅₀	Concentração que reduz 50% do título viral
IL	Interleucina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
Na⁺/K⁺ - ATPase	Bomba de sódio e potássio ATPase
Na⁺/Ca²⁺	Trocador de sódio e cálcio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NS	Não estrutural
NSP	Proteína não-estrutural
OMS	Organização Mundial da Saúde
OUA	Ouabaína
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
prM/M	Pré-membrana/membrana
MOI	Multiplicidade de infecção
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
p38	Proteína quinase ativadora de mitógeno p38
SCZ	Síndrome Congênita do Zika vírus
SFB	Soro fetal bovino
Src	Proteína quinase não receptora Src
TCID₅₀	Do inglês <i>"50% Tissue Culture Infectious Dose"</i>
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
ZIKV	Zika vírus
ZIKV PE243	ZIKV/H.sapiens/Brasil/PE243/2015 Vírus do Nilo Ocidental
6MMPr	Nucleosídeo 6-metilmercaptapurinaribosídica

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1 Ouabaína e seus efeitos imunomodulatórios.....	14
2.2 Atividade antiviral da ouabaína.....	18
2.3 ZIKV: da descoberta ao surto.....	20
2.4 O ZIKV e sua funcionalidade estrutural.....	22
2.5 Ciclo de replicação do ZIKV e a resposta antiviral do hospedeiro.....	25
2.6 Manifestações clínicas do ZIKV.....	31
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Obtenção da substância teste.....	35
4.2 Linhagens celulares.....	35
4.3 Vírus.....	35
4.4 Determinação das concentrações não tóxicas de ouabaína através de análise mitocondrial por MTT.....	35
4.5 Ensaio antiviral.....	36
4.6 Titulação viral por TCID ₅₀	37
4.7 Tratamento da SH-SY5Y infectada com ZIKV.....	37
4.8 Seleção de participantes.....	38
4.9 Isolamento de macrófagos humanos.....	38
4.10 Estabelecimento da cocultura.....	39
4.11 Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas.....	39
4.12 Análise de proteínas intracelulares envolvidas no mecanismo de ação da ouabaína.....	39
4.13 Análises estatísticas.....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Determinação da toxicidade da ouabaína em células SH-SY5Y.....	41
5.2 Efeito antiviral da ouabaína em células SH-SY5Y infectadas com ZIKV.....	42
5.3 Atividade imunomodulatória da ouabaína durante infecção pelo ZIKV de células de neuroblastoma.....	43
5.4 Perfil de produção de citocinas na cocultura de macrófagos humanos com células de neuroblastoma infectadas com ZIKV e tratadas com ouabaína.....	46
5.5 Efeito da ouabaína nos níveis de fosforilação de proteínas intracelulares de células SH-SY5Y durante infecção com o ZIKV.....	47
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) é um flavivírus, envelopado e que apresenta genoma formado por ácido ribonucleico (RNA) de fita única e senso positivo. Este vírus apresenta como principal vetor de transmissão, os mosquitos do gênero *Aedes*, tal qual *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) Albopictus*, todavia também pode ser transmitido de forma vertical, através de relações sexuais, transfusões de sangue, transplante de órgãos e exposição laboratorial (Karkhah et al., 2018).

O ZIKV foi identificado pela primeira vez em 1947 na Floresta de Zika, localizada na Uganda, contudo, apenas se tornou um vírus de preocupação global nos últimos anos, após epidemia do vírus no Brasil. Na ocasião a infecção pelo ZIKV foi associada a incidência de deformidades congênitas em fetos, como a microcefalia, bem como, de acometimentos do sistema nervoso em adultos, como a Síndrome de Guillain-Barré (Musso; Ko; Baud, 2019).

Atualmente, sabe-se que a infecção pelo ZIKV é capaz de deflagrar a Síndrome Congênita associada a infecção pelo vírus Zika (SCZ) em embriões e que uma das possíveis manifestações desta Síndrome é a microcefalia. Além disso, já se é compreendido os mecanismos pelo qual o ZIKV pode comprometer o sistema nervoso de indivíduos adultos, facilitando o desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré (Marbán-Castro et al., 2021). Essas complicações derivam da capacidade do ZIKV de infectar e induzir a apoptose de um amplo espectro de células do sistema nervoso, como neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, células de Schwann, células progenitoras neurais e células progenitoras gliais. A ação do vírus nessas células acaba por ocasionar também o desenvolvimento de um ambiente cerebral inflamatório que por sua vez contribui para os efeitos deletérios do ZIKV no sistema nervoso (Blackhurst; Funk, 2023).

Mesmo com os avanços na compreensão de seus mecanismos virais, ainda não existem tratamentos específicos aprovados para a infecção do ZIKV, além disso, as vacinas com o desenvolvimento mais avançado, ainda estão passando por testes clínicos (De Sales-Neto et al., 2024). Diante dos riscos que o ZIKV apresenta para a saúde global, é imperativo a busca por tratamentos capazes de debelar sua infecção e prevenir suas complicações.

Neste contexto, a ouabaína (OUA) recebe destaque. A OUA é um esteroide cardiotônico endógeno, encontrado no sangue de mamíferos em concentrações

variáveis. Assim como outros esteroides cardiotônicos, essa molécula é capaz de interagir com a Na^+/K^+ -ATPase e inibir sua atividade de forma dose-dependente (Blaustein, 1993).

Além do efeito fisiológico clássico da ouabaína como uma substância inotrópica positiva, esta molécula apresenta diversas atividades biológicas, como atividade imunomoduladora, descrita tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* (Leite et al., 2022). Adicionalmente, já foi elucidada a ação antiviral da ouabaína contra 3 linhagens de ZIKV: o ZIKV PE243 do Brasil (Carvalho et al., 2022), o ZIKV H/PF/2013 da Polinésia Francesa e o ZIKV MRS da Martinica (Guo et al., 2020). Entretanto, ainda não foram investigados os efeitos antivirais e imunomodulatórios da ouabaína em linhagens de células neurais infectadas com o ZIKV.

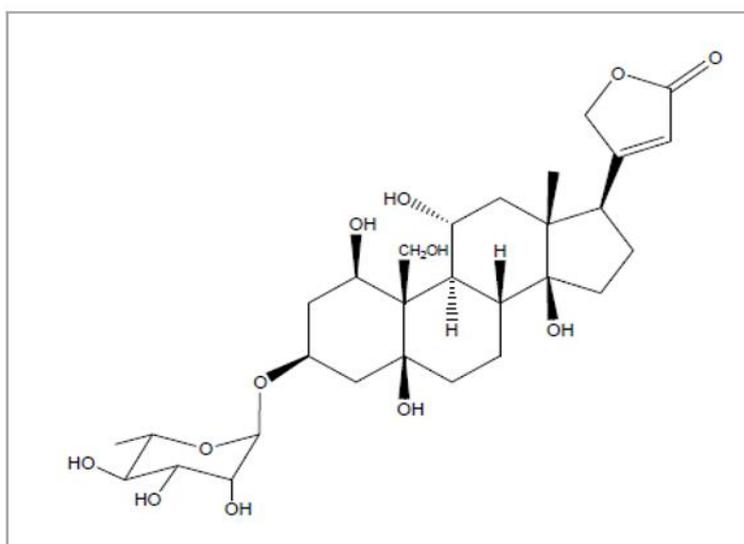
Diante do que foi exposto, o presente trabalho buscou investigar a atividade antiviral e imunomodulatória da ouabaína contra o ZIKV, utilizando a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y, visando obter uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos neste processo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Ouabaína e seus efeitos imunomodulatórios

Isolada e cristalizada por Leon-Albert Arnaud de cascas do tronco da árvore *Acokanthera schimperi* (Arnaud, 1888), ouabaína foi classificada como esteroide cardiotônico e por muito tempo creditada como uma molécula oriunda do metabolismo secundário de plantas. Apresenta como estrutura molecular, um núcleo esteroidal ligado a um anel lactona de 5 membros e a um açúcar (ramnose) como pode ser observado na Figura 1 (Leite, 2012).

Figura 1 - Estrutura da ouabaína.



Fonte: Leite, 2012. Anel de lactona de 5 membros encontra-se ligado em C17. O açúcar ramnose encontra-se ligado em C3. O núcleo esteroide da ouabaína é altamente oxigenado (oxigênio nas posições C1, 3, 5, 11, 14 e 19). Composto altamente hidrossolúvel e pouco absorvido pelo trato gastrointestinal.

Com base em sua estrutura, classifica-se como um esteroide cardiotônico e como outros representantes desta família de moléculas é capaz de interagir com a Na^+/K^+ -ATPase e inibir sua atividade (Blaustein, 1993). Esta proteína é uma bomba, que é expressa na membrana plasmática das células de diversos organismos de forma ubíquitosa. Atua promovendo o transporte dos íons sódio e potássio através da membrana plasmática contra os seus gradientes de concentração, para tal, realiza hidrólise de ATP, em vista de fornecer a energia necessária para ocorrência deste transporte ativo (Shatzmann, 1953).

Historicamente, os esteroides cardiotônicos foram utilizados para tratar insuficiência cardíaca congestiva devido a ação cardiotônica que era observada

mediante administração destas moléculas (Rosen; Moran, 1963). Entretanto, o mecanismo envolvido nesse efeito fisiológico era desconhecido. Em 1960, descobriu-se o trocador Na^+/Ca^+ no musculo cardíaco de mamíferos, o que permitiu postular a hipótese de que a inibição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase realizada pelos esteroides cardiotônicos ocasionava a perda do gradiente eletroquímico dos íons Na^+ e K^+ , o que promoveria reversão do trocador Na^+/Ca^+ , ocasionando aumento da concentração de íons cálcio no citosol. Essa ocorrência em células do musculo cardíaco, levaria a elevação da força de contração cardíaca, o que explicaria os efeitos positivos da utilização dos esteroides cardiotônicos no tratamento da insuficiência cardíaca obstrutiva (Akeria; Brody, 1977).

A ouabaína por muito tempo foi considerada uma molécula exógena, porém em 1991, Hamlyn e colaboradores identificaram a presença de ouabaína endógena no plasma de mamíferos. Futuramente, observou-se que a ouabaína era produzida pela glândula adrenal e tinha sua liberação controlada pelo aumento das concentrações plasmáticas de sódio, angiotensina II e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Schoner, 2000). Diante da descoberta de que a ouabaína era sintetizada pelo organismo e liberada na corrente sanguínea frente perturbações da homeostase controlando processos fisiológicos, esta molécula passou a ser considerada um hormônio esteroideal (Schoner, 2002).

Mesmo que a Na^+/K^+ -ATPase seja o único receptor estabelecido para os esteroides cardiotônicos e que sua inibição leve a modificações no equilíbrio iônico celular (Dvela et al., 2007), diversos estudos demonstraram que a Na^+/K^+ -ATPase também atua como uma importante transdutora de sinal (Fan; Xie; Tian, 2017). Tal fato está relacionado com uma população específica de Na^+/K^+ -ATPase localizada em regiões da membrana celular conhecidas como calvéolas. Essas bombas calveolares não desempenham o papel clássico de transporte iônico pois encontram-se ligadas a quinase Src, que mantém seu funcionamento inativo (Liang et al., 2007). Quando um esteroide cardiotônico se liga a estas bombas, ocorrem mudanças conformacionais que levam a ativação da Src com subsequente fosforilação de várias tirosinas, deflagrando vias de sinalização celular que podem controlar processos como proliferação e motilidade celular (Barwe et al., 2005; Liu, 2004) a expressão de genes (Xie; Askari, 2002) e a apoptose (Wang et al., 2003).

Dialogando com a descoberta dos efeitos modulatórios dos esteroides cardiotônicos não relacionados com a inibição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase,

diferentes estudos evidenciaram atividade imunomoduladora da ouabaína, tanto em células da imunidade inata como da imunidade adaptativa (Rodrigues-Mascarenhas et al., 2009). Foi demonstrado que a ouabaína é capaz de inibir a proliferação de linfócitos induzida por mitógenos (fito-hemaglutinina - PHA) (Dornand et al., 1986). Também foi observado que este efeito se repetia utilizando outros estímulos, como éster de forbol (Brodie et al., 1995; Olej et al., 1994), anti-CD3 (Szamel et al., 1995), ionóforo de cálcio (Jensen et al., 1977) e interleucina (IL)-2 (Redondo; Lopez Rivas; Fresno, 1986).

No entanto, apesar do efeito inibitório sobre a proliferação linfocitária, as células estimuladas com PHA e tratadas com ouabaína expressavam CD69, molécula relacionada ao processo de ativação celular (Aussel et al., 1996; Pires et al., 1997), indicando que elas eram responsivas aos estímulos, porém não conseguiam prosseguir no ciclo celular. Esse efeito ocorria, em parte, pela inibição da expressão de CD25 e/ou liberação de IL-2 (Dornand et al., 1986; Olej et al., 1994; Szamel et al., 1995).

Apesar do seu efeito antiproliferativo, foi demonstrado que a ouabaína não interfere no efeito citotóxico de células NK (natural killer) (De Moraes et al., 1989) e células LAK (lymphokine-activated killer) (Olej et al., 1994). Além disso, evidenciou-se também que a ouabaína modula negativamente a maturação de linfócitos B (De Moraes et al., 1989).

A ouabaína também atua em timócitos de coelho inibindo a proliferação celular (Szamel; Schneider; Resch, 1981), induzido a expressão de CD69, através do influxo de cálcio (Rodrigues-Mascarenhas et al., 2003), inibindo a ativação da MAPK p38 e reduzindo os níveis do fator nuclear de ativação de células T c1 (Rodrigues-Mascarenhas et al., 2009). Ademais, estudos apontam que a ouabaína atua sinergicamente com glicocorticoides para induzir atrofia tímica (Rodrigues-Mascarenhas; Dos Santos; Rumjanek, 2006).

Em monócitos humanos, a ouabaína regula negativamente a expressão de mCD14, uma molécula de superfície envolvida na resposta contra bactérias Gram-negativas, por meio da ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico e da MAPK p38 (Valente et al., 2009). Além disso, monócitos tratados com ouabaína apresentam níveis elevados de CD69, HLA-DR, CD86 e CD80, marcadores de ativação celular, além de aumentar a capacidade fagocítica dessas células (Teixeira; Rumjanek, 2014).

O efeito da ouabaína sobre a produção de citocinas depende do estado de ativação celular. Na ausência de estímulos, a ouabaína pode induzir a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α e diminuir a produção de IL-6 em monócitos (Foey; Crawford; Hall, 1997). No entanto, quando estes são estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), o tratamento com ouabaína reduz os níveis dessas três citocinas (Matsumori et al., 1997).

Nosso grupo vem demonstrando que ouabaína, e outros esteroides cardiotônicos (p.ex., marinobufagina) (Carvalho et al., 2019), apresentam efeito anti-inflamatório em diversos modelos, com redução da migração de células para o sítio inflamado, modulação de fatores de transcrição e diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias (Cavalcante-Silva et al., 2017)

De Vasconcelos e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento com a ouabaína reduz o edema de pata induzido por zimosan, carragenina, prostaglandina E₂, bradicinina e pelo composto 48/80. Em conjunto a isso, a ouabaína reduz a resposta inflamatória desencadeada pela infecção causada por *Leishmania amazonensis* em camundongos (Jacob et al., 2013) e também modula negativamente os processos alérgico e inflamatório nos pulmões, reduzindo a migração eosinofílica, a produção de citocinas do perfil Th2 e atenuando a presença de muco nos bronquíolos (Galvao et al., 2017; Galvao et al., 2022). Adicionalmente, nosso grupo demonstrou que a ouabaína reduz a permeabilidade vascular e os níveis de IL-1 β e TNF- α , efeito associado à redução da translocação do fator nuclear κ B (NF- κ B) para o núcleo celular (Leite et al., 2015), além de reduzir a fosforilação da MAPK p38 em neutrófilos estimulados por zymosan, potencialmente interferindo no processo de migração destas células (Cavalcante-Silva et al., 2021). Em acordo com estas descobertas, outros grupos também demonstraram o efeito inibitório da ouabaína na migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (Olej et al., 1994; Ray; Samanta, 1997; Ward; Becker, 1970).

Diante do que foi exposto, percebe-se que a ouabaína apresenta, de forma bem descrita, atividade imunomodulatória em diversos modelos, sendo capaz de inibir a proliferação linfocitária, migração de leucócitos para o sítio inflamado, reduzir a produção de citocinas e mediadores da inflamação e modular vias celulares associadas a resposta inflamatória, como a sinalização do NF- κ B (Leite et al., 2022; Cavalcante-Silva et al., 2017)

2.2 Atividade antiviral da ouabaína

Além da capacidade imunomoduladora da ouabaína e de outros esteroides cardiotônicos, a atividade antiviral dessas moléculas vem sendo descrita para diversos vírus, tanto de RNA quanto de DNA, através de mecanismos de ação distintos que interferem em diferentes fases do ciclo de replicação do viral (Amarelle; Leucona, 2018).

A ouabaína demonstrou inibir *in vitro* a replicação do citomegalovírus humano (HCMV), um vírus de DNA amplamente distribuído na população mundial que desempenha perigo para pacientes imunossuprimidos e recém-nascidos podendo desempenhar graves complicações neurológicas. Na ocasião, a ouabaína não apenas inibiu a síntese de proteínas virais como reduziu a ativação do fator de transcrição NF- κ B (Kapoor et al., 2012), o que ressalta o efeito duplo desta molécula, que é capaz de atuar como uma molécula antiviral e apresentar atividade imunomoduladora.

Outro estudo utilizando o vírus de DNA herpes simplex vírus (HSV) demonstrou que o tratamento com ouabaína de células Vero infectadas reduziu a expressão de genes associados com a replicação do HSV (Dodson et al., 2007).

No que tange o efeito da ouabaína contra vírus de RNA, já foi demonstrado que a ouabaína em concentrações nanomolares, é capaz de inibir a replicação dos vírus da influenza (IAV) H1N1 e H3N3 e o mecanismo pelo qual essa molécula exerce seu efeito antiviral possivelmente relaciona-se com a Na⁺/K⁺-ATPase (Amarelle et al., 2019; Mi et al., 2010). Isso dialoga com estudo de Hoffmann (2008) que demonstrou que o aumento das concentrações de íons sódio no meio intracelular prejudica o processo de replicação do vírus da Influenza, como o tratamento com a ouabaína é capaz de elevar os níveis citoplasmáticos de íons sódio, isso explicaria sua atividade antiviral posteriormente descrita para este vírus. Corroborando com a importância da Na⁺/K⁺-ATPase na replicação do vírus da Influenza, estudo de Mi et al., (2010) mostrou que células nocautes para a subunidade β 1 desta bomba, apresentavam menor replicação do vírus da Influenza.

Contribuindo para os efeitos antivirais da ouabaína, foi demonstrado que o tratamento com ouabaína, em baixas concentrações, foi capaz de reduzir a internalização celular de vírus da família coronavírus (CoV) (Islam et al., 2020). Adicionalmente, foi demonstrado que a ouabaína apresenta atividade antiviral contra o coronavírus da gastroenterite (TGEV) de forma dependente da sinalização PI3K –

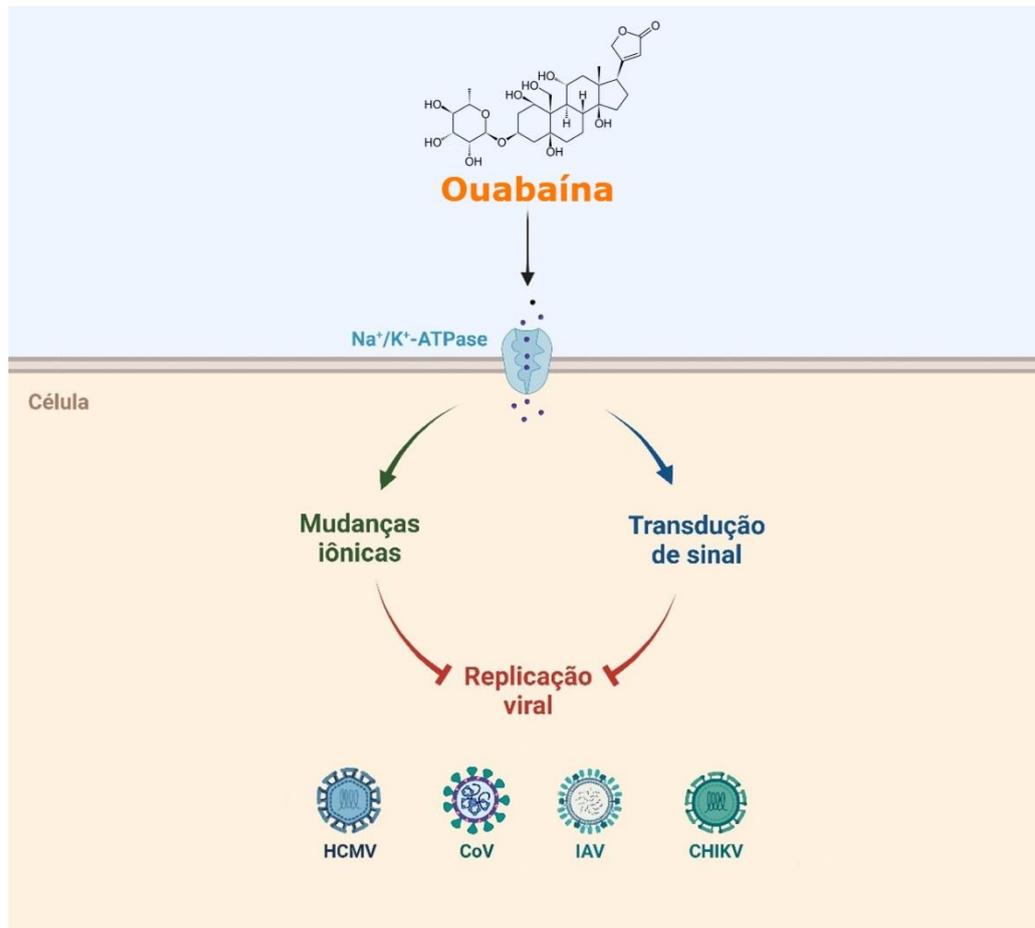
PDK1, reduzindo também os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 previamente aumentados pela infecção por esse coronavírus (Yang, 2018).

Outros vírus pelo qual a ação antiviral da ouabaína foi também observada são: o vírus Ebola (Dowall et al., 2016; García-Dorival et al., 2014), o vírus causador da Chikungunya (CHIKV) (Ashbrook et al., 2016) e do vírus da encefalite japonesa (Guo et al., 2020).

Em adição a isso, nosso grupo demonstrou efeito antiviral da ouabaína contra o ZIKV, estabelecendo também através de ensaios *in silico* possíveis alvos moleculares em que a ouabaína apresenta afinidade de ligação, a exemplo das proteínas virais NS5 e NS3 (Carvalho et al., 2022), que como já demonstrado são essenciais para replicação do ZIKV.

Diante do que foi exposto, percebe-se que a ouabaína é uma molécula com potencial de ser utilizada como antiviral, sendo necessário avaliar sua atividade contra os mais variados tipos virais. Seu mecanismo de atuação possivelmente envolve a Na^+/K^+ -ATPase (Figura 3), contudo vias de atuação alternativas não podem ser descartadas e devem ser investigadas. Nesse contexto, o ZIKV torna-se um candidato válido para ser avaliado o efeito antiviral da ouabaína, principalmente em células neurais, por motivos que serão melhor explorados posteriormente.

Figura 2 – Atividade antiviral da ouabaína



Fonte: Adaptado de De Sales-Neto e colaboradores (2024). O efeito antiviral da ouabaína está relacionado com o seu receptor a Na⁺/K⁺-ATPase. Esta ligação pode resultar em alterações nas concentrações intracelulares de sódio e/ou também desencadear uma transdução de sinal. Ambos os mecanismos estão envolvidos na capacidade da molécula em bloquear a replicação viral. HCMV: citomegalovírus humano; CoV: Coronavírus; IAV: Vírus da Influenza; CHIKV: vírus da Chikungunya.

2.3 ZIKV: da descoberta ao surto

O ZIKV é um flavivírus transmitido principalmente através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* competentes (Alissa; Alsuwat; Alzahrani, 2024), porém também pode haver transmissão através de relações sexuais, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e de forma vertical, ou seja, da mãe para o feto durante a gravidez (Masmajan et al., 2020). É o vírus causador da febre Zika, porém é capaz de deflagrar outras comorbidades como a síndrome de Guillain-Barré (GBS) em adultos e a síndrome congênita do Zika (SCZ) em fetos (Pierson; Diamond, 2018).

Foi isolado pela primeira vez em 1947 de macacos rhesus febris, na floresta de Zika, localizada em Entebbe, na Uganda (Dick; Haddow, 1952). Após sua identificação, foram registrados menos de 20 ocorrências de humanos infectados e

todas restritas a região onde o vírus foi inicialmente foi isolado (Faye et al., 2014).

Todavia, em 2007, na região da Micronésia, mais especificamente na ilha Yap, houve um surto de infecções pelo ZIKV, nesta ocasião, aproximadamente 3/4 da população da ilha se infectou com o vírus, apresentando apenas sintomas leves, como febre, dores nas juntas, manchas na pele e conjuntivite (Duffy et al., 2009).

Posteriormente, houve outro surto de ZIKV, desta vez na Polinésia Francesa, entre outubro de 2013 e março de 2014 (Cao-Lormeau et al., 2013), foi durante este surto que se relatou pela primeira vez casos de GBS concomitantes a infecção pelo ZIKV e questionou-se a respeito das possíveis complicações que uma infecção com sintomas comumente brandos poderia ocasionar (Oehler et al., 2014).

O maior surto de ZIKV da história ocorreu em 2015 no Brasil, com posterior disseminação do vírus para outros países da região (Fauci; Morens, 2016). Em 2017, o ZIKV já circulava em 52 países das Américas, com mais de 22 mil casos confirmados e 580 mil suspeitas (Pierson; Diamond, 2018). Durante este surto foi visualizado um maior número de bebês nascidos com deformidades congênitas, principalmente relacionadas ao desenvolvimento neural, como a microcefalia, o que acabou por estabelecer a relação entre a infecção pelo ZIKV de mulheres grávidas e o nascimento de bebês com deformidades congênitas, ressaltando a capacidade deste vírus de ser transmitido de forma transversal (Johansson et al., 2016). Juntamente a isso, os casos de GBS também se exacerbaram durante este período, expressando mais uma vez a relação entre esta síndrome e a infecção pelo ZIKV (Capasso et al., 2019). Diante destes agravamentos e de sua disseminação no mundo, a infecção pelo ZIKV deixou de ser uma ocorrência local com pouco impacto, cuja infecção ocasionava sintomas brandos, para um problema de preocupação global que necessitava ser compreendido e manejado, visando o bem-estar da humanidade (de Oliveira et al., 2017). Hoje, casos de ZIKV já foram reportados em mais de 80 países, com maior expressividade em regiões tropicais e subtropicais onde os mosquitos vetores encontram-se presentes (Agarwal; Chaurasia, 2021).

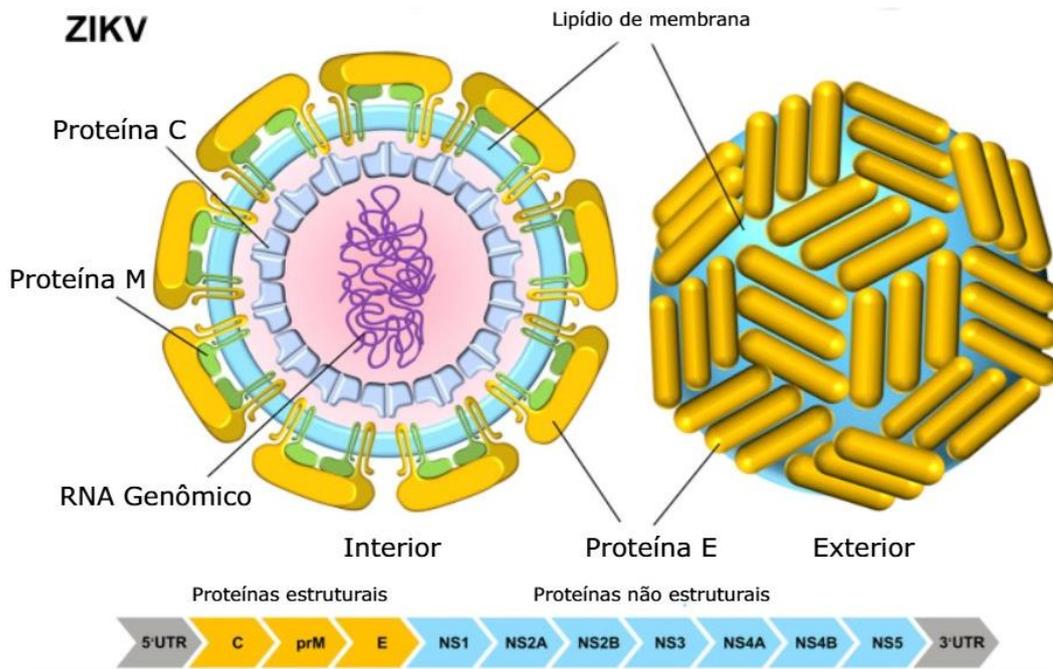
Apesar da potencialidade do ZIKV em comprometer a saúde global, até o momento, não existem tratamentos específicos aprovados ou vacinas desenvolvidas disponíveis para prevenir ou debelar a infecção causada pelo vírus e as doenças associadas a mesma (Haddad et al., 2024). Dessa forma, é essencial compreender os mecanismos virais exercidos pelo ZIKV que permitem sua proliferação no organismo, bem como as respostas imunológicas que são deflagradas mediante

infecção, uma vez que entender como o ZIKV tem sucesso proliferativo e exerce sua patogenicidade é essencial no desenvolvimento de estratégias para prevenir e tratar as doenças causadas por este vírus.

2.4 O ZIKV e sua funcionalidade estrutural

Para compreender de forma holística o ZIKV e suas interações com o hospedeiro, é necessário visualizar suas partes formadoras e compreender as suas funções. Sabe-se que o ZIKV é um pequeno vírus de RNA de fita única e envelopado, capaz de adentrar as células hospedeiras através de endocitose mediada por receptores (Mirza et al., 2022). A partícula viral é composta por 3 proteínas estruturais, 7 proteínas não estruturais e pelo seu genoma que consiste em RNA ribossomal, que é traduzido em uma única poliproteína na qual é clivada para originar as distintas proteínas virais, como pode ser observado na Figura 1 (Sirohi; Kuhn, 2017). As proteínas envelope (E), membrana (M) e capsular (C) são as proteínas estruturais do vírus. As proteínas E e M interagem entre si formando um heterodímero que se encontra ancorado na membrana lipídica do vírus através de uma estrutura de hélice transmembrana que por sua vez tem conexão com a proteína C no envelope lipídico (Perera et al., 2023). No ZIKV imaturo, ao invés da proteína M, encontra-se presente sua proteína precursora, a proteína pré-membrana (prM). As proteínas prM\M e E passam por diversas modificações conformacionais durante o ciclo de vida do ZIKV, apresentando-se de formas distintas no vírus maduro, imaturo e durante sua fusão a membrana plasmática das células (Feng et al., 2024).

Figura 3 – Estrutura do ZIKV e seu genoma



Fonte: Adaptado de Feng (2024)

A proteína estrutural E é uma proteína de membrana que confere estrutura, permite a adesão viral e a penetração do ZIKV nas células hospedeiras. Esta proteína se liga a receptores presentes na superfície das células permitindo a adesão viral. Uma vez que o vírus esteja aderido, a proteína E mediará a fusão entre o vírus e a célula hospedeira com a consequente transferência do material genético viral para essas células, tal processo ocorre através de sequências de alterações estruturais que em última instância possibilitam a entrada viral (Hu et al., 2021).

A proteína estrutural prM participa da montagem, liberação e maturação viral, além de contribuir com a infectividade do ZIKV. Mediante replicação viral, a proteína prM recém-formada, interage com a proteína E, originando a partícula viral imatura. A proteína prM protege a proteína E de mudanças conformacionais irreversíveis induzidas pelo ambiente ácido do complexo de Golgi, impedindo a fusão prematura das partículas virais com a membrana celular da célula hospedeira (Mulgaonkar et al., 2022). Além disso, prM também é necessária para o correto dobramento da proteína E e para a estruturação das partículas virais. Durante o translado das partículas virais imaturas através do ambiente ácido do complexo de golgi, a proteína prM sofre mudanças conformacionais que possibilitam a ação da protease furina, essa por sua

vez cliva prM em duas proteínas, a proteína M e a proteína precursora, que embora separadas permanecem aderidas a estrutura viral. Quando as partículas virais são liberadas no meio extracelular, a mudança para um ambiente com o pH neutro faz com que a proteína precursora se dissocie da estrutura do vírus, contudo a proteína M permanece aderida a partícula viral, o que completa seu processo de maturação (Dai et al., 2016). A proteína M compreende uma porção significativa da membrana externa da partícula viral e está envolvida em diversas interações entre o ZIKV e as células hospedeiras (Feng et al., 2024).

A proteína estrutural C é necessária para o processo de montagem e empacotamento das partículas virais. Esta proteína é capaz de interagir com o RNA do genoma viral e recrutar partículas celulares para encapsular este genoma. A proteína C madura também atua regulando o processo de replicação viral e é capaz de alterar o ambiente intracelular das células hospedeiras em prol da replicação do ZIKV (Zhang et al., 2021).

As proteínas não estruturais, denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 e o RNA ribossomal contendo os genes virais, são englobados pelas proteínas estruturais, formando assim o vírion do ZIKV. O RNA ribossomal viral é o material genético primário do ZIKV e depende das proteínas não estruturais para ser replicado (Surya; Honey; Torres, 2024).

A proteína NS1 está envolvida em múltiplos estágios do ciclo de infecção do ZIKV, a exemplo da replicação viral e da formação de vesículas, além de interagir com diversas proteínas do hospedeiro envolvidas com o processamento de RNA, regulação da expressão gênica e homeostase celular. Além disso, essa proteína não estrutural também está relacionada com a capacidade do ZIKV em evadir do processo de monitoramento do sistema imunológico e é conhecida por contribuir com o avanço da doença causada pelo ZIKV ao alterar o glicocálix endotelial e as conexões intercelulares das células hospedeiras, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias e de autoanticorpos (Perera et al., 2023). A proteína NS3 atua juntamente com a proteína NS2B, necessitando que estejam conectadas para exercerem sua função de forma efetiva, NS3-NS2B são proteases e são essenciais para a proliferação viral uma vez que clivam a poliproteína viral originando as diversas proteínas estruturais e não estruturais do ZIKV (Hilgenfeld; Lei; Zhang, 2018). A proteína NS5 é a maior e mais conservada proteína do ZIKV, consiste em um domínio estrutural N-terminal que atua como uma metiltransferase e um domínio estrutural C-

terminal que atua como uma RNA-polimerase dependente de RNA, sendo essencial para a replicação do RNA viral (Wang et al., 2018). Além disso, essa proteína também é responsável por interferir negativamente na sinalização do interferon ao inibir a fosforilação de STAT1 e degradar STAT2 (Xie; Zeng, 2021). Por fim, NS2A, NS4A e NS4B estão relacionadas com a patogenicidade do ZIKV em humanos e interferem nas respostas imunológicas ao vírus, contudo suas estruturas ainda não foram definidas (Feng et al., 2024).

Dessa forma, para fins de compreensão, entende-se que as proteínas estruturais do ZIKV são essenciais para conferir a forma das partículas virais, orquestrar o processo de maturação e liberação do vírus, proteger o material genético do vírus, identificar receptores das células hospedeiras permitindo adesão e internalização viral, além de dar suporte para o processo de replicação viral, enquanto as proteínas não estruturais são essenciais para replicação do RNA viral, processamento do produto obtido pela tradução do RNA viral, além de interagir com diversas proteínas do hospedeiro, controlando processos de evasão viral e modulando respostas inflamatórias e portanto estão associadas com a virulência e a patogenicidade do ZIKV.

2.5 Ciclo de replicação do ZIKV e a resposta antiviral do hospedeiro

O ciclo replicativo do ZIKV se inicia durante o repasto sanguíneo de mosquitos *Aedes* competentes que apresentem partículas de ZIKV viáveis em seu trato gastrointestinal. Mediante picada, ocorre inoculação do vírus diretamente na derme do indivíduo, juntamente com o fluido salivar do mosquito (Martina; Koraka; Osterhaus, 2009). Então, os vírus inoculados se ligam as células alvo através de diversas estruturas, como a molécula de adesão intercelular 3 específica de células dendríticas (DC-SIGN) e proteínas receptoras de fosfatidilserina, como o receptor de tirosina cinase 3 (TYRO3) e o receptor de tirosina cinase AXL, de forma que a interação do ZIKV com essas estruturas é essencial para o processo de adesão e replicação viral nas células hospedeiras (De Sales-Neto et al., 2024). Dentre os diversos receptores celulares que interagem com o ZIKV, o receptor AXL recebe destaque por estar associado a susceptibilidade de fibroblastos a infecção pelo ZIKV (Hamel et al., 2015). Este receptor é bem expresso em células da glia e em células do córtex humano em desenvolvimento, o que pode explicar o tropismo que o ZIKV apresenta para estes

tipos celulares (Mwaliko et al., 2021). O ZIKV interage com o receptor AXL através da proteína do gene 6 específico de crescimento (Gas6) que apresenta afinidade por fosfatidilserina, que encontra-se presente na membrana viral do ZIKV. Dessa forma, quando a proteína Gas6 que se encontra interagindo com o ZIKV encontra um receptor AXL e se liga a ele, uma interação indireta ocorre entre AXL e ZIKV, o que facilita o processo de internalização viral (Meertens et al., 2017).

Uma vez que a partícula do ZIKV é internalizada na célula, o RNA viral é liberado, dando início ao processo de tradução das proteínas virais, que resulta em uma única poliproteína que é formada pelas proteínas estruturais C, prM/M e E bem como pelas proteínas não estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Pielnaa et al., 2020). A poliproteína do ZIKV é clivada por proteases do hospedeiro e pela protease viral NS3, que atua em conjunto com o co-fator NS2b para formar o complexo proteolítico ativo NS2b3 (Sha et al., 2018). As proteínas não estruturais do ZIKV encontram-se colocalizada em vesículas derivadas da membrana do retículo endoplasmático, formando o complexo de replicação viral. Dentro desses complexos de replicação, a proteína NS3 desempenha função de helicase e a proteína NS5 função de RNA polimerase dependente de RNA, juntas estas proteínas orquestram o processo de replicação do genoma viral (Neufeuldt et al., 2018). As proteínas estruturais do ZIKV em conjunto com diversas proteínas não estruturais, passam pelo processo de montagem viral na membrana do retículo endoplasmático e então as novas partículas virais formadas saem da célula, completando o ciclo infeccioso (Sherman; Gack 2019).

Durante infecções virais, fagócitos profissionais como células dendríticas (DCs), neutrófilos, monócitos e macrófagos são capazes de detectar a presença viral e montar respostas imunológicas antivirais que contribuem com a eliminação do patógeno em questão (Sekaran et al., 2022).

Para detectar a incidência de um vírus no organismo, as células do sistema imune inato reconhecem lipídeos, sequências de ácidos nucleico e carboidratos que comumente compõem a estrutura de diversos vírus e geralmente são essenciais para sua virulência e sobrevivência. Essas moléculas oriundas de patógenos que são reconhecidas pelo sistema imune inato são chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Além das PAMPs, as células do sistema imune inato também reconhecem padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que costumam ser liberados pelas células durante a infecção viral. As PAMPs e as DAMPs

são reconhecidas através de receptores de reconhecimento de padrão (PRR). São os PRRs que permitem que células do sistema imune inato reconheçam a presença viral no organismo. Um dos principais PRRs envolvidos no reconhecimento viral são os receptores do tipo Toll (TLRs) (Sekaran et al., 2022).

Os TLRs são receptores de reconhecimento de padrão capazes de se ligar a uma grande variedade de moléculas oriundas de patógenos e moléculas endógenas associadas ao dano celular (Aluri; Cooper; Schuettpelz, 2021). Esses receptores são proteínas transmembranas do tipo 1 formados por 3 domínios: o domínio de reconhecimento de ligantes rico em repetições de leucina, o domínio transmembrana, e o domínio de homologia do receptor Toll/IL-1 (Gay et al., 2014). Se tratando do reconhecimento do ZIKV e montagem da resposta antiviral, os TLRs mais envolvidos são TLR3 (Dang et al., 2016), TLR7 (Santos et al., 2023) e TLR8 (Garcia JR et al., 2023). TLR3 reconhece RNA de fita dupla (dsRNA) viral, enquanto TLR7 e TLR8 reconhecem RNA de fita única (ssRNA) (Kawasaki; Kawai, 2014).

Mediante reconhecimento de dsRNA, TLR3 é ativado e interage com o fator indutor de interferon relacionado ao domínio Toll/IL-1 (TRIF), ativando o mesmo. Uma vez ativo TRIF se liga ao fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF) 3 e a quinase 1 ligada ao receptor do fator de necrose tumoral (TBK1) o que leva a ativação dos fatores reguladores de Interferon (IRF) 3 e 7, que então se translocam para o núcleo celular e regulam positivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (Oshiumi et al., 2003). TRIF ativo também interage com TRAF6 que então fosforila o fator nuclear κ B (NF- κ B) e modulando positivamente a via das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs) (Sato et al., 2003). NF- κ B fosforilado adentra o núcleo celular e induz a expressão de genes relacionados com a inflamação. Além disso, MAPKs fosforiladas ativam diversos substratos, como fatores de transcrição que assim como NF- κ B, ao serem ativos migram para o núcleo celular e induzem a expressão de genes também relacionados com a inflamação (Kim; Choi, 2010). Os produtos obtidos da expressão destes genes, incluem quimiocinas, MHC, co-estimuladores e citocinas pró-inflamatórias (Medzhitov, 2001) como Interleucina (IL)-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF) - α e interferons (IFN) do tipo 1 (Da silva et al., 2019).

Já TLR7 e TLR8 ao reconhecerem ssRNA no endossomo, se ativam e recrutam a molécula da resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MyD88) que então interage com as quinases associadas ao receptor de interleucina 1 (IRAK) 1 e 2,

formando um complexo que interage com TRAF6 levando a ativação de NF- κ B e IRF7 o que resulta na produção de moléculas associada a inflamação, especialmente IFN do tipo 1 (Mogensen et al., 1999)

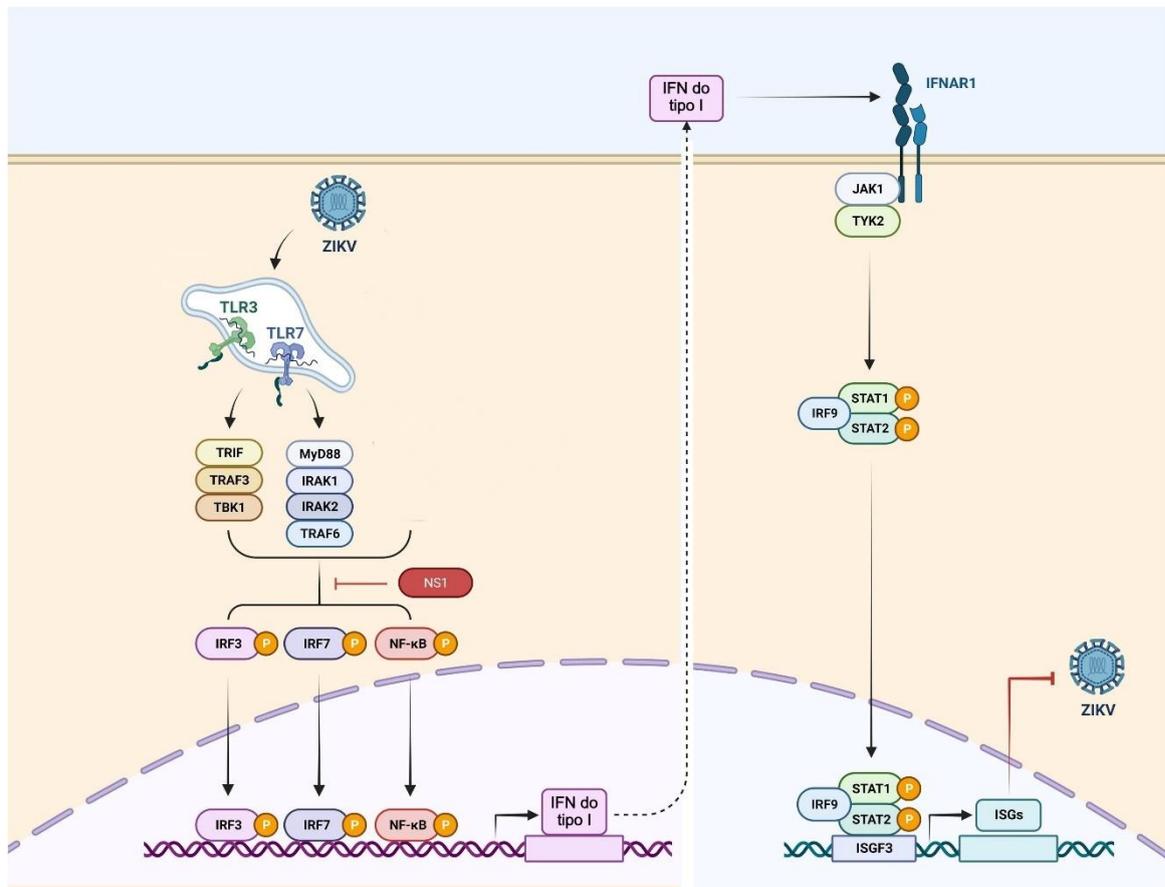
Os IFN do tipo 1 produzidos mediante ativação dos TRLs, como descrito acima, são as principais citocinas envolvidas na resposta antiviral. Quando IFN- α e IFN- β interagem com o receptor de IFN- α/β (IFNAR) que se encontra presente na superfície das células, mecanismos celulares são ativados culminando com a inibição da replicação viral (Da silva et al., 2019).

IFNAR é composto de duas subunidades (IFNAR1 e IFNAR2), quando IFNs do tipo 1 se ligam a subunidade IFNAR1, ocorre recrutamento e ativação de Janus quinase 1 (JAK1) e tirosina quinase 2 (TYK2). Estas quinases ao serem ativas promovem fosforilação e dimerização do transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) 1 e 2 (Mogensen et al., 1999). O dímero formado interage com IRF-9 formando um complexo chamado de fator 3 de genes estimulados por interferons (ISGF3). ISGF3 migra para o núcleo celular e ativa a transcrição de genes induzidos por IFNs do tipo 1 através do elemento de resposta estimulado por IFN (ISRE) (Samuel, 2001). A expressão destes genes origina produtos que irão deflagrar a resposta antiviral e exercer atividade protetiva contra a infecção causada pelo ZIKV.

Contudo, o ZIKV apresenta alguns mecanismos de evasão as respostas imunes, que permitem sua replicação nas células hospedeira e culminam com a progressão da infecção (Bowen et al., 2017). Como exemplo, a proteína NS1 do ZIKV é capaz de modular negativamente a via do NF- κ B em células dendríticas plasmocitoides, inibindo a expressão de genes de IFN do tipo 1 (Giraldo; Gonzalez-Orozco; Rajsbaum, 2023)

Os mecanismos envolvidos na montagem da resposta antiviral inata acima descritos, encontram-se representados na Figura 2 que foi adaptada do trabalho de De Sales-Neto e colaboradores (2024).

Figura 4 – Resposta antiviral inata mediante infecção pelo ZIKV



Fonte: Adaptado de De Sales-Neto (2024). Após a entrada do ZIKV na célula, nos endossomos, o RNA viral interage com TLR3 na forma de dsRNA e com TLR7 e TLR8 na forma de ssRNA. Quando o TLR3 interage com o dsRNA, ocorre uma mudança conformacional nesse receptor, ativando o TRIF. O TRIF ativo interage com TRAF3 e TBK1, induzindo a ativação de IRF3 e IRF7, que então translocam para o núcleo da célula e regulam positivamente a expressão de genes relacionados à inflamação. O TRIF ativo também pode interagir diretamente com TRAF6, induzindo a fosforilação de NF-κB. O NF-κB fosforilado migra para o núcleo e induz a expressão de genes relacionados à inflamação. Enquanto isso, TLR7 e TLR8, ao interagirem com o ssRNA viral, tornam-se ativados e recrutam o adaptador de sinalização intracelular MyD88, que interage com IRAK1, IRAK2 e IRAK4, formando um complexo que se liga ao TRAF6, ativando-o. O TRAF6 ativado leva à fosforilação de NF-κB e IRF7, induzindo a produção de moléculas associadas à inflamação. IFN-α e IFN-β interagem com IFNAR1, ativando JAK1 e TYK2. Essas quinases induzem a fosforilação de STAT1 e STAT2, formando um dímero. Esse dímero se associa a IRF9, formando o complexo ISGF3. O ISGF3 migra para o núcleo e induz a expressão de ISGs através de ISRE. Os produtos desses genes exercem atividade protetora contra a infecção pelo ZIKV. Como mecanismos de evasão, o ZIKV pode inibir a fosforilação de NF-κB através da NS1.

As MAPKs são proteínas quinases que possuem sua expressão e ativação moduladas por estímulos externos como fatores de crescimento, glutamato, hormônios, estresse celular e patógenos, a exemplo de vírus (Origlia et al., 2009).

Essas proteínas são amplamente expressas em células neuronais e não neuronais e controlam processos como diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (Corrêa et al., 2012).

As MAPKs consistem em três quinases de serina/treonina e suas isoformas: ERK 1-8, JNK 1-3 e p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$. As cascatas de sinalização das MAPKs levam a ativação de fatores de transcrição que promovem a expressão de genes alvo (Kim; Choi, 2015).

A MAPK p38 é essencial no processo de diferenciação de células neurais imaturas. A ativação desta proteína é necessária para formação de neuritos e sobrevivência de células neuronais nos estágios finais de seu processo de diferenciação, uma vez que o fator de crescimento nervoso ao ativar p38 previne a morte celular (Aouadi et al., 2006). Além disso, a ativação de p38 modula positivamente as respostas inflamatórias e encontra-se diretamente associada com a replicação viral, de forma que moléculas moduladoras desta quinase vem demonstrando atividade antiviral em modelos *in vitro* (Quintana et al., 2020).

Já as ERK 1/2 são proteínas quinase efetoras de cascatas de sinalização envolvidas com a progressão do ciclo celular. A desregulação destas proteínas está relacionada com diversas condições patológicas. Sabe-se que infecções virais são capazes de manipular a sinalização das ERK, promovendo internalização viral, desregulando o ciclo celular, sequestrando a maquinaria celular em detrimento da replicação viral e prevenindo a apoptose das células infectadas, contribuindo assim com a progressão da infecção (Sun et al., 2015).

Também modulada mediante infecções virais, o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma quinase de serina/treonina que também regula o crescimento e a proliferação celular mediante estímulos ambientais (Hall, 2008). Estudos demonstraram que a infecção pelo ZIKV de células tronco neurais leva a inibição da sinalização do mTOR, induzindo apoptose celular e promovendo a diferenciação imatura dessas células (Rothan et al., 2019).

O mTOR atua em conjunto com outras duas proteínas: fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e a proteína quinase B (AKT), na via da PI3K-Akt-mTOR, de forma que a ativação de PI3K leva a ativação de Akt que conseguinte ativa mTOR (Liang et al., 2016). Akt é a proteína central desta via, sendo essencial para o desenvolvimento cerebral e a plasticidade sináptica (Franke, 2008). Mutações em Akt que a tornam não funcional demonstram ocasionar microcefalia em humanos (Mirzaa et al., 2013)

enquanto mutações que ocasionam ativação constitutiva desta quinase levam a megalencefalia (Neilist et al., 2015).

Por fim, a tirosina-quinase Src regula vias de crescimento, divisão, migração e sobrevivência celular (Roskoski, 2015). Esta quinase encontra-se associada a membrana plasmática e atua como transdutora de sinais oriundos de receptores de membrana, a exemplo da Na⁺/K⁺-ATPase (Liang et al., 2007). Esta proteína, mediante ativação, fosforila diversas moléculas intracelulares, como P13K e sua atividade encontra-se associada a replicação de diversos vírus que regulam a atividade desta proteína afim de terem sucesso replicativo. Como exemplo o poliomavírus e o herpes-vírus conhecidamente regulam a ativação de Src, de formas distintas, para facilitar o processo de replicação viral. Enquanto o poliomavírus promove ativação da sinalização do Src, induzindo transformação oncogênica das células infectadas o que facilita a produção de suas proteínas virais, o herpes-vírus reduz a sinalização de Src para escapar do processo de imunovigilância (Dunant; Ballmer-Hofer, 1997).

Diante do que foi exposto, percebe-se que mediante reconhecimento do ZIKV por receptores celulares, modificações intracelulares são induzidas que permitem a montagem da resposta antiviral e inflamatória do organismo que tem como intuito debelar a propagação viral. Por outro lado, o ZIKV é capaz de modular a ativação de proteínas intracelulares, a exemplo das MAPKs, promovendo mudanças celulares que facilitam o processo de replicação viral e permitem a progressão da infecção.

2.6 Manifestações clínicas do ZIKV

A maioria das infecções causadas pelo ZIKV são assintomáticas (aproximadamente 80%) (Faria et al., 2016). Uma parcela de 20% dos infectados apresentará sintomas, que comumente se assemelham aos de outras arboviroses, como a dengue. Estes sintomas são: febre, erupção cutânea, artralgias e conjuntivite que duram em média de uma a duas semanas (Agumadu; Ramphul 2018).

Embora os sintomas comumente sejam brandos, a infecção pelo ZIKV pode apresentar complicações graves, a exemplo da Síndrome de Guillain-Barré (Cao-Lormenau et al., 2016) e da Síndrome congênita do ZIKV (SCZ) que se refere deformidades congênitas associadas a transmissão materno-fetal do ZIKV (Marques et al., 2019).

Uma das manifestações da SCZ é a microcefalia, que é induzida pelo ZIKV

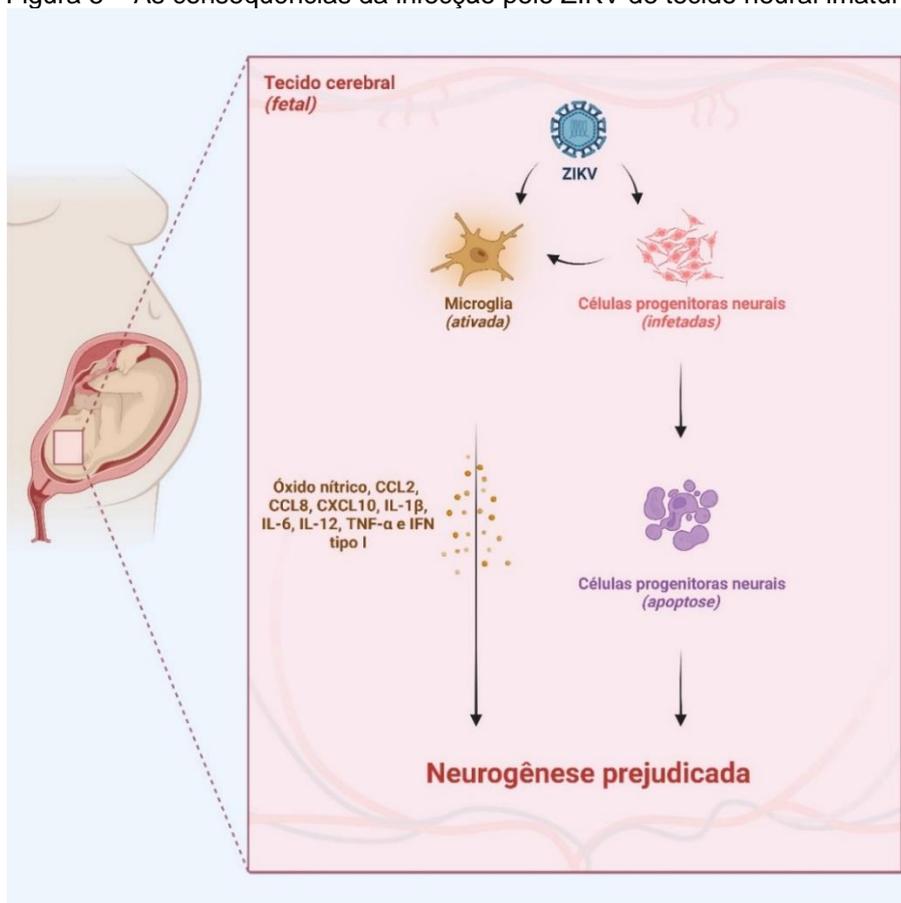
devido a sua capacidade de inibir o processo de neurogênese ao infectar células precursoras neurais, deflagrando processos como apoptose e autofagia (Ahmad et al., 2018; Yoon et al., 2017). Uma das explicações para isso é o fato de que as proteínas do ZIKV NS4A e NS4B inibem a sinalização Akt-mTOR, que é essencial para o processo de desenvolvimento neural. A inibição dessa via leva ao comprometimento da proliferação celular e induz a apoptose de células tronco neurais fetais, o que explica o prejuízo a neurogênese visualizado na SCZ (Figura 5) (Liang et al., 2016).

Além do efeito citopático exercido pelo ZIKV em células nervosas, a infecção pelo vírus deflagra a produção de mediadores pró-inflamatórios, a exemplo das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6, das quimiocinas CXCL-8 e MCP-1 e espécies reativas de nitrogênio. Estes mediadores estabelecem a neuroinflamação (Figura 5) (Diop et al., 2018; Lum et al., 2017).

Embora o processo inflamatório iniciado pela infecção do ZIKV seja parte da resposta antiviral do organismo e essencial para debelar a infecção do patógeno, a nível de tecido nervoso, pode trazer efeitos deletérios permanentes (Lima et al., 2019). Células tronco neurais expostas a níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias possuem processos de diferenciação e proliferação celular desregulados que contribuem com o surgimento da microcefalia. Em adição, bloquear a produção de citocinas pró-inflamatórias traz benefícios para o processo de neurogênese outrora prejudicado pelo ZIKV (Wang et al., 2018)

Tendo em vista os efeitos imunomodulatórios e antivirais já descritos para a ouabaína, essa molécula apresenta grande potencial de ser utilizada contra a infecção causada pelo ZIKV. Com isso, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade imunomoduladora e antiviral da ouabaína em células de linhagem de neuroblastoma humano infectadas com ZIKV e elucidar os mecanismos pelo qual estes efeitos ocorrem. Os dados aqui obtidos podem ajudar a estabelecer a ouabaína como um potencial agente terapêutico no tratamento da infecção causada pelo ZIKV, além de ajudar a compreender o seu mecanismo de atuação.

Figura 5 – As consequências da infecção pelo ZIKV de tecido neural imaturo



Fonte: Adaptado de De Sales-Neto et al., 2024. A infecção pelo ZIKV no tecido neural fetal prejudica a neurogênese tanto por induzir a produção de mediadores pró-inflamatórios quanto por ação direta em células progenitoras neurais, levando a apoptose e autofagia das mesmas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade imunomoduladora e antiviral da ouabaína em células de linhagem de neuroblastoma humano infectadas com zika vírus.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a toxicidade da ouabaína em células SH-SY5Y através do ensaio de citotoxicidade pelo método MTT;
- Avaliar se a ouabaína interfere na replicação do ZIKV em células SH-SY5Y;
- Determinar o efeito da ouabaína na produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α pelas células SH-SY5Y infectadas com o ZIKV.
- Avaliar se o tratamento com ouabaína das SH-SY5Y infectadas com o ZIKV modificará o perfil de produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10, quando essas células estiverem em cocultura com macrófagos humanos.
- Avaliar o efeito da ouabaína nos níveis de fosforilação das proteínas intracelulares: ERK, p38, Src, NF-kB, AKT e m-TOR das SH-SY5Y infectada

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da substância teste

A ouabaína foi comprada da Sigma-Aldrich. As diluições foram preparadas de acordo com as concentrações necessárias para cada ensaio.

4.2 Linhagens celulares

Para a realização dos experimentos foi utilizada a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y. As células SH-SY5Y foram cultivadas em DMEM/Ham's F-12 (Inlab Diagnóstica) contendo piruvato de sódio (1 Mm), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (0,1 g/ml), l-glutamina (2 mM) e suplementado com 10% de SBF (Gibco).

A linhagem de células Vero também foi utilizada para obtenção do título viral de distintas amostras contendo ZIKV, através do método TCID₅₀ que será descrito posteriormente.

Além das linhagens, foram utilizados macrófagos humanos diferenciados de monócitos isolados de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de acordo com protocolo descrito posteriormente.

4.3 Vírus

A cepa do ZIKV que foi utilizada foi cedida pelo Prof. Dr. Lindomar José Pena. Esta cepa foi isolada a partir do sangue de um paciente com doença exantemática no Estado de Pernambuco e é denominada ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/2015 (GenBank: KX197192.1), encontrando-se disponível no Departamento de Virologia da Fiocruz/PE.

As partículas virais do ZIKVPE243 foram propagadas em células Vero durante 5 dias. Após esse tempo, os sobrenadantes das culturas de células Vero infectadas foram recuperados e os títulos virais destes sobrenadantes foram obtidos através do método TCID₅₀. Estes sobrenadantes foram então armazenados em freezer -80 °C para posterior utilização.

4.4 Determinação das concentrações não tóxicas de ouabaína através de análise mitocondrial por MTT

A viabilidade celular foi determinada através do método de MTT (brometo de 3-

metil-[4-5dimetiltiazol-2-il] -2,5 difeniltetrazólio) descrito por Mosmann (1983). Esse método baseia-se na capacidade das enzimas mitocondriais (desidrogenases) de células viáveis transformarem o sal de tetrazólio (MTT), de cor amarela, no seu derivado formazan azul (cor violeta). Dessa maneira, quanto maior a intensidade da cor violeta, mais células metabolizaram o MTT em cristais de formazan e assim, maior a viabilidade celular. Para a realização deste ensaio, as células da linhagem SH-SY5Y foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de 4×10^4 células/poço. As células foram mantidas *overnight* a 37 °C e posteriormente tratadas com diferentes concentrações de ouabaína (1, 5, 10, 50, 100 nM e 0.5, 1.5, 10, 50, 100 e 500 μ M). A aferição da viabilidade foi feita nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas, para tal, o meio de cultivo foi removido e meio novo com o acréscimo de 1 mg/ml de MTT foi adicionado a cada poço. Em seguida, a microplaca foi incubada durante quatro horas a 37 °C. Após este tempo, o sobrenadante foi removido e foram acrescentados 100 μ l de DMSO para solubilização dos cristais de formazan formados. A viabilidade celular foi quantificada pela medida da densidade óptica no comprimento de onda de 570 nm, determinada por um leitor de placas. A partir da análise dos dados no GraphPad Prism, foram calculados a CC50 e a CC20, ou seja, a concentração do composto que reduziu 50% e 20%, respectivamente, a viabilidade celular. O valor da CC20 e suas diluições foram utilizadas no ensaio antiviral a ser descrito posteriormente.

4.5 Ensaio antiviral

Para avaliar o efeito antiviral da ouabaína, células SH-SY5Y foram previamente semeadas na concentração de 2.5×10^4 células/poço em placas de 48 poços e mantidas *overnight* para adesão celular. Em seguida, o ZIKV foi acrescentado em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.1 por 1 hora a 37 °C. Após o tempo de infecção, o sobrenadante contendo as partículas virais foi aspirado e as células lavadas com PBS para retirar as partículas virais não internalizadas, em seguida, foi iniciado o tratamento com ouabaína em concentrações referentes a 1, 1/2, 1/4 e 1/8 da CC₂₀. As células foram então incubadas a 37 °C em 5% de CO₂ por 72 horas. Os controles incluíram o grupo MOCK (apenas células), o grupo de células infectadas, mas não tratadas e um grupo que foi infectado e tratado com uma droga previamente identificada como um potente inibidor de ZIKV, o análogo de nucleosídeo 6-

metilmercaptipurinaribosídica (6MMPr) (Carvalho et al., 2017). Ao fim do tempo de tratamento o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80 °C para posteriormente ser utilizado em ensaio de título viral por TCID₅₀ visando avaliar a quantidade de vírus presente nestes sobrenadantes e se o tratamento com ouabaína alterou o mesmo.

4.6 Titulação viral por TCID₅₀

As células Vero foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 células/poço a 37 °C em uma incubadora de CO₂ a 5% um dia antes da titulação. Os sobrenadantes oriundos dos ensaios antivirais foram diluídos em série, 10 vezes (10^{-1} a 10^{-6}) em DMEM. Os sobrenadantes diluídos foram então adicionados às células, que foram incubadas por 5 dias a 37 °C e 5% de CO₂. O efeito citopático (positivo ou negativo) foi avaliado em microscópio óptico invertido, a partir do qual obteve-se o título viral, utilizando o método TCID₅₀, como descrito por Reed e Muench em 1938. Os resultados foram expressos como log₁₀ TCID₅₀/mL, que se refere ao log de 10 da dose viral necessária para infectar 50% das células cultivadas (TCID₅₀). Esse método não revela a quantidade de unidades virais totais em uma dada amostra, mas sim qual a dose ou diluição dessa amostra que é capaz de ocasionar efeito citopático em 50% das células utilizadas no ensaio. Dessa forma, é um método que contabiliza a quantidade de vírus infectante, ou seja, a quantidade de partículas virais presentes na amostra que efetivamente estão infectando e se replicando nas células, induzindo como consequência, efeitos citopáticos observáveis.

4.7 Tratamento da SH-SY5Y infectada com ZIKV

As células SH-SY5Y foram cultivadas em placas de cultivo celular na concentração celular ideal para cada experimento, em meio de cultivo DMEM/F12 acrescido de 10% soro bovino fetal e 1% Estreptomicina/Penicilina e mantidas overnight (12 horas) em estufa de cultivo celular com atmosfera umidificada de 5% CO₂ e 95% de ar a 37°C. Em seguida, o meio foi aspirado e as partículas de ZIKV previamente diluídas em meio de cultivo foram inoculadas nos poços, em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.1. O vírus permaneceu em contato com as células por uma hora. Após esse tempo, o meio foi aspirado e foram feitas lavagens sucessivas com PBS para retirada de partículas virais não internalizadas pelas células, concluindo assim o processo de infecção. Por fim, os grupos foram

estabelecidos, sendo a ouabaína acrescentada na concentração ideal obtida a partir dos ensaios antivirais.

4.8 Seleção de participantes

De acordo com projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências Médicas da UFPB, de CAAE número 74320323.2.0000.8069, para realizar o processo de isolamento de monócitos do sangue periférico de humano, indivíduos saudáveis que estudam na Universidade Federal da Paraíba (n=20) foram convidados a participar do estudo. Após o aceite e a assinatura do Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) (ANEXO I) um volume de 20mL de sangue periférico foi coletado de acordo com protocolo descrito adiante. Os critérios de inclusão foram os seguintes: ter entre 18 e 60 anos; ser estudante da Universidade Federal da Paraíba; assinar o TCLE. Já os critérios de exclusão foram: estar com doença infecciosa ativa; possuir doenças autoimunes; ser fumante.; ser gestante ou lactante; ter feito uso de medicação anti-inflamatória, álcool ou drogas ilícitas nas últimas 24h; não assinar o TCLE.

4.9 Isolamento de macrófagos humanos

Previamente ao isolamento de macrófagos humanos, sangue periférico foi coletado de doadores saudáveis, de qualquer tipo sanguíneo. A coleta foi feita por profissionais treinados. Inicialmente, as células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas do sangue coletado utilizando o método de gradiente por Ficoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, os monócitos foram isolados das PBMCs ao permitir sua adesão em placas de cultivo celular tratadas, na presença de meio de cultivo sem soro, por duas horas. Após o tempo de adesão, o meio foi aspirado e foram feitas lavagens sucessivas com PBS, para selecionar apenas os monócitos aderidos. Os monócitos foram diferenciados em macrófagos ao serem mantidos em meio de cultivo RPMI acrescido de 20 ng/mL de M-CSF (Preprotech) e 10% de soro bovino fetal inativado em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ e 95% de ar a 37°C durante 7 dias (Schulz et al., 2019). Após esse tempo, as células foram observadas em microscópio ótico invertido, para avaliar o processo de diferenciação. Em seguida, os macrófagos foram recuperados e utilizados para o estabelecimento da cocultura.

4.10 Estabelecimento da cocultura

Após o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos, infecção das SH-SY5Y com o ZIKV e tratamento com a ouabaína, a cocultura foi realizada. Para tal, ambos tipos celulares foram soltos de suas superfícies de crescimento e contabilizados utilizando microscopia óptica em conjunto com câmara de Neubauer e coloração com azul de tripan. Após determinação das concentrações de SH-SY5Y e macrófagos, a cocultura foi estabelecida, semeando $1,5 \times 10^6$ células por poço de SH-SY5Y e 5×10^5 células por poço de macrófagos humanos em placas de 24 poços tratadas para crescimento de células aderentes. Os grupos estabelecidos foram: macrófagos, macrófagos com SH-SY5Y, macrófagos com SH-SY5Y tratadas com ouabaína, macrófagos com SH-SY5Y infectadas com ZIKV e macrófagos com SH-SY5Y infectadas com ZIKV e tratadas com ouabaína. Após 24 horas, os sobrenadantes dessas coculturas foram recuperados para dosagem de citocinas.

4.11 Ensaios imunoenzimáticos para dosagem de citocinas

Para quantificação das citocinas foi utilizado o ensaio de imunoabsorção enzimática ELISA sanduíche. As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α foram quantificadas no sobrenadante das culturas de SH-SY5Y infectadas com ZIKV e tratadas com ouabaína, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Já nos sobrenadantes da cocultura, foram quantificadas pelo mesmo método as citocinas IL-6, IL-10 e IL-1 β . O ELISA sanduíche foi realizado de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). A leitura das placas foi realizada em leitor de placa no comprimento de ondas de 450 nm.

4.12 Análise de proteínas intracelulares envolvidas no mecanismo de ação da ouabaína

As SH-SY5Y previamente infectadas com ZIKV e tratadas com ouabaína durante 72 horas foram coletadas e tiveram sua concentração ajustada de acordo com as necessidades experimentais. A forma fosforilada das proteínas SRC, ERK, p38, AKT, mTOR e NF- κ B dos diferentes grupos de SH-SY5Y foram marcadas separadamente com os seus anticorpos específicos, conforme as instruções de cada fabricante. Por fim, as células foram lavadas e suspensas em PBS para leitura em

citômetro de fluxo, a fim de determinar a taxa de ativação dessas proteínas intracelulares.

4.13 Análises estatísticas

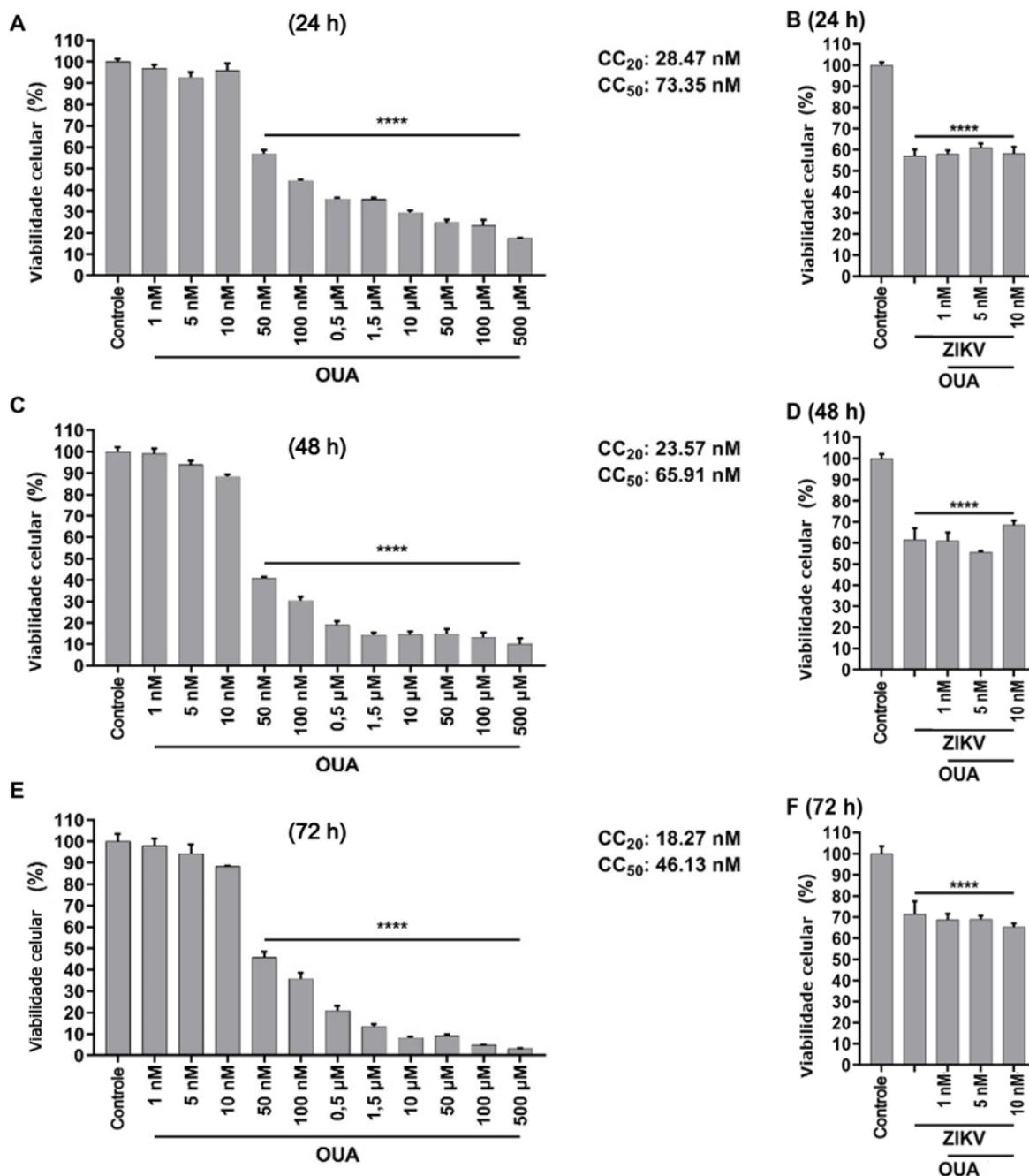
Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados empregando-se a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, US). Os dados de citometria de fluxo também foram analisados utilizando o software FlowJo versão 10 (FlowJo LLC, Ashland, OR, US)

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da toxicidade da ouabaína em células SH-SY5Y

Através do método de redução do MTT, é possível determinar as concentrações de ouabaína que reduzem a viabilidade celular das células SH-SY5Y. Os ensaios demonstraram que até concentrações de 10 nM a ouabaína não reduziu a viabilidade das SH-SY5Y em nenhum dos tempos de tratamento (24, 48 e 72 horas; Figura 6 A, C e E respectivamente). As concentrações responsáveis por reduzir a viabilidade celular em 20% (CC₂₀) e em 50% (CC₅₀) no tempo de tratamento de 72 horas (tempo máximo de tratamento para os ensaios posteriores) foram de 18,27 nM e 46,13 nM respectivamente. Dessa forma, a concentração máxima escolhida para a realização dos ensaios posteriores foi de 18 nM, uma aproximação da CC₂₀, uma vez que faz referência a toxicidade máxima tolerável para visualizar efeitos não relacionados a morte celular (Carvalho et al., 2017). Por outro lado, concentrações mais altas de ouabaína (50 nM – 500 µM) reduziram expressivamente a viabilidade celular. Ademais, as concentrações de ouabaína que não reduziram a viabilidade celular (1 nM – 10 nM) não aumentaram a morte celular induzida pela infecção do ZIKV (Figura 6 B, D e F), portanto, o tratamento com ouabaína não atua de forma sinérgica com a infecção do ZIKV para indução da morte celular.

Figura 6 - Viabilidade de células SH-SY5Y tratadas com ouabaína



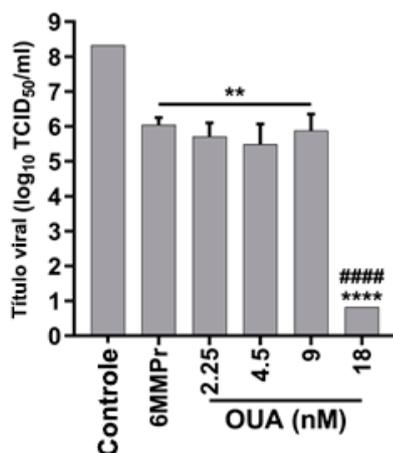
Células SH-SY5Y não infectadas foram tratadas com ouabaína (1 nM – 500 µM) nos tempos de 24 horas (A) 48 horas (C) e 72 horas (E). As concentrações de ouabaína que não reduziram a viabilidade celular (1-10 nM) foram também utilizadas em células infectadas com ZIKV (MOI:0.1) nos tempos de 24 (B), 48 (D) e 72 horas (F). Gráficos demonstram a viabilidade celular (%) nas diferentes concentrações de ouabaína; OUA= ouabaína; CC₂₀ = concentração que reduz a viabilidade celular em 20%, CC₅₀= concentração que reduz a viabilidade celular em 50%, ZIKV = Células SH-SY5Y infectadas com ZIKV (MOI:0.1); ****: diferenças significativas em relação ao grupo controle (p<0.5); os resultados estão representados como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes, os dados foram tratados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey utilizando o GraphPad Prism®.versão 9.

5.2 Efeito antiviral da ouabaína em células SH-SY5Y infectadas com ZIKV.

A partir da CC₂₀ da ouabaína no tempo de 72 horas (18.24 nM) escolheu-se a

concentração de 18 nM e diluições da mesma (9, 4.5 e 2.24 nM) para tratamento das células SH-SY5Y infectadas com ZIKV a fim de determinar se a ouabaína afetaria a propagação viral nessas células. Como demonstrado na Figura 7, a ouabaína foi capaz de reduzir significativamente o título viral quando comparado ao grupo controle. Essa redução foi observada em todas as concentrações testadas (2.25, 4.5, 9 e 18 nM). A maior concentração (18 nM) reduziu o título viral em 7 log₁₀ em comparação ao grupo controle, o que é maior do que a redução alcançada com o controle positivo, o 6MMPr na concentração de 60.5 µM (de Carvalho et al., 2017). Adicionalmente, esses dados corroboram com trabalho anterior de nosso grupo, que demonstrou a redução do título do ZIKV pela ouabaína em células Vero (Carvalho et al., 2022).

Figura 7 - Efeito da ouabaína no título viral do ZIKV



Após 1 h de infecção com ZIKV PE243 (MOI: 0.1), as células SH-SY5Y foram tratadas com OUA (18 nM) e após 72 h, o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID₅₀. Os resultados foram expressos como média ± SEM de três experimentos independentes e analisados utilizando o GraphPad Prism® 10.1.2, por meio de análise de variância unidirecional seguida pelo teste de Tukey. **** p < 0,05 comparados com o grupo controle e #### p < 0,05 comparados com todos os outros grupos.

Com base no que foi exposto, a concentração de 18 nM foi a escolhida para averiguar se além do efeito antiviral visualizado, a ouabaína apresentaria ação imunomodulatória durante a infecção do ZIKV, o que estaria de acordo com os efeitos já descritos para esta molécula em outros trabalhos.

5.3 Atividade imunomodulatória da ouabaína durante infecção pelo ZIKV de células de neuroblastoma

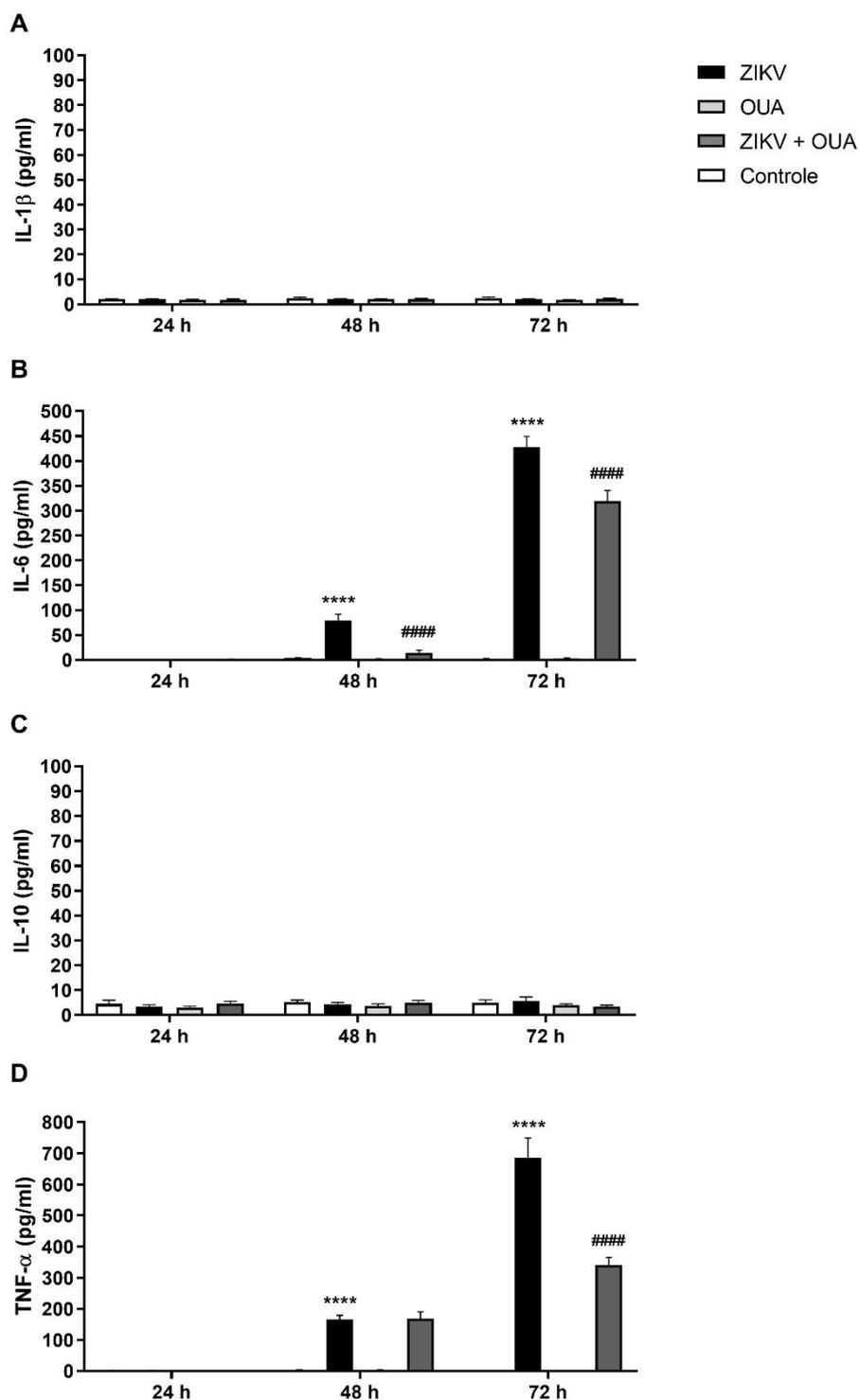
Durante a infecção pelo ZIKV ocorre elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais deflagram processos inflamatórios robustos, que desencadeiam o comprometimento neuronal (Crisanto-Lopez et al., 2023; De Sales-Neto et al., 2024).

Dessa forma, para investigar os efeitos da ouabaína na inflamação desencadeada pelo ZIKV, células SH-SY5Y infectadas com ZIKV foram tratadas com 18 nM de ouabaína. Em seguida a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , bem como da citocina anti-inflamatória IL-10, foram determinadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Observou-se que a infecção do ZIKV em células SH-SY5Y promoveu um aumento significativo da produção e liberação das citocinas IL-6 (Figura 8B) e TNF- α (Figura 8D) de forma dependente de tempo, com a concentração máxima dessas citocinas no sobrenadante visualizada no tempo de 72 horas. Todavia, a infecção pelo ZIKV das SH-SY5Y não levou a um aumento da produção e liberação das citocinas IL-10 e IL-1 β (Figura 8 C e A respectivamente).

Após 48 horas de tratamento, a ouabaína reduziu apenas a produção de IL-6 (redução de 83%), previamente induzida pelo ZIKV, como demonstrado na Figura 8B. Contudo, após 72 horas de tratamento, a ouabaína reduziu de forma significativa tanto a produção de IL-6 (redução de 25%), quanto a produção de TNF- α (Redução de 50%) como demonstrado na Figura 8B e 8D. Dessa forma, o tempo de 72 horas foi escolhido como tempo de tratamento e como tempo pós-infecção para os experimentos seguintes.

Figura 8 - Efeito da ouabaína na produção de citocinas pelas células SH-SY5Y infectadas com ZIKV



Concentração de citocinas (pg/mL) pelo tempo de tratamento (24, 48 e 72 horas) na concentração de ouabaína de 18 nanomolar; Controle = Grupo contendo células SH-SY5Y não tratadas e não infectadas; ZIKV = Grupo contendo células SH-SY5Y infectadas com ZIKV (MOI: 0.1) e não tratadas; OUA = Grupo contendo células SH-SY5Y não infectadas e tratadas com ouabaína (18 nM); ZIKV + OUA = Grupo infectado com ZIKV(MOI: 0.1) e tratado com ouabaína (18 nM); A = Dosagem da citocina IL-1 β ; B = dosagem da citocina IL-6; C= dosagem da citocina IL-10; D = dosagem da citocina TNF- α ; **** = diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p < 0.5$); #### = diferenças significativas em relação ao grupo ZIKV ($p < 0.5$); Os valores foram apresentados como média \pm e.p.m. e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós- teste de Tukey.

5.4 Perfil de produção de citocinas na cocultura de macrófagos humanos com células de neuroblastoma infectadas com ZIKV e tratadas com ouabaína

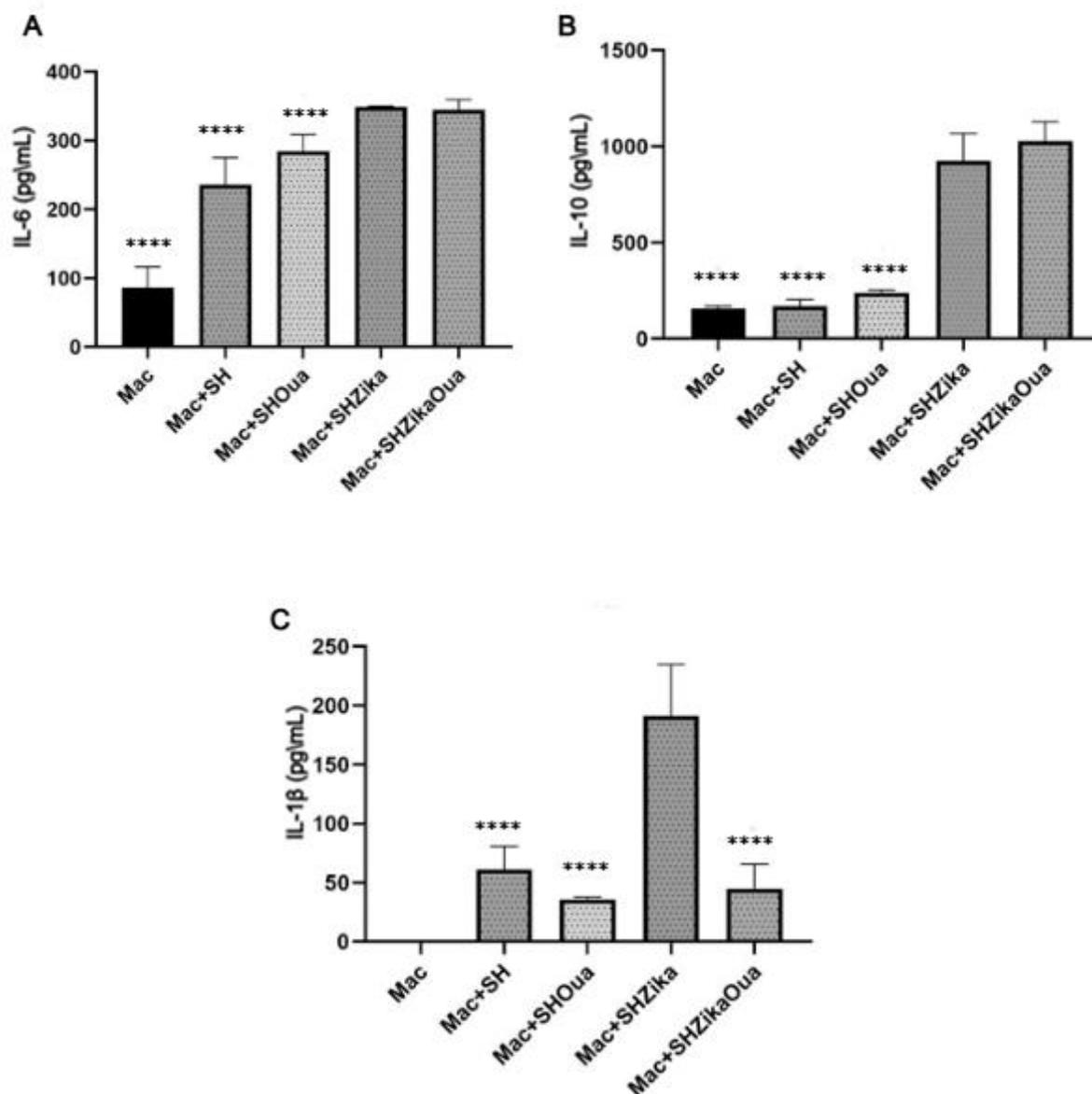
Considerando que as células SH-SY5Y infectadas com ZIKV apresentam uma maior produção de citocinas inflamatória, como já demonstrado, buscou-se avaliar qual seria o perfil de produção de citocinas na cocultura dessas células com macrófagos humanos. Além disso, foi investigado se o tratamento com ouabaína das SH-SY5Y infectadas com ZIKV, previamente ao estabelecimento da cocultura, iria interferir nessa produção.

Foi avaliado a produção das citocinas IL-10, IL-1 β e IL-6, após 24 horas de cocultura das células SH-SY5Y com macrófagos humanos, nas diversas condições experimentais já descritas. Observou-se que a cocultura de macrófagos humanos com células SH-SY5Y infectadas com ZIKV apresentou uma produção significativamente maior de IL-6 (Figura 9A), IL-10 (Figura 9B) e IL-1 β (Figura 9C) do que a produção visualizada na cocultura com as SH-SY5Y não infectadas. Considerando que na cultura individual das SH-SY5Y infectadas não foi possível detectar quantidades significativas de IL-1 β , percebe-se então que foi a interação dessas células com macrófagos humanos que deflagrou a produção dessa citocina.

Nesse trabalho, o tratamento com ouabaína (18 nM) de células de neuroblastoma infectadas com ZIKV, previamente ao estabelecimento da cocultura com macrófagos humanos, levou a uma redução significativa na produção de IL-1 β pela cocultura (Figura 9C), que retomou a níveis próximos aos encontrados na cocultura com células de neuroblastoma não infectadas.

Por fim, o tratamento prévio com ouabaína de células de neuroblastoma infectadas com ZIKV não foi capaz de modular a produção de IL-10 e IL-6 quando essas células foram colocadas em cocultura com macrófagos humanos.

Figura 9 – Dosagem de citocinas no sobrenadante da cocultura (SH-SY5Y + macrófagos humanos)



Concentração de citocinas (pg/mL) dosadas nos sobrenadantes das coculturas; Mac = Grupo contendo apenas macrófagos humanos; Mac+SH = Grupo contendo células SH-SY5Y não infectadas e não tratadas em conjunto com macrófagos; Mac+SHOua = Grupo contendo células SH-SY5Y não infectadas com ZIKV e tratadas com ouabaína (18 nM) + macrófagos humanos; Mac + SHZika = células SH-SY5Y infectadas com ZIKV (MOI: 0.1) e não tratadas com ouabaína; ; Mac + SHZikaOua = células SH-SY5Y infectadas com ZIKV (MOI: 0.1) e tratadas com ouabaína (18 nM); A = Dosagem da citocina IL-6; B = dosagem da citocina IL-10; C= dosagem da citocina IL-1β; **** = diferenças significativas em relação ao grupo Mac+SHZika ($p < 0.5$); Os valores foram apresentados como média \pm e.p.m. e analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de pós- teste de Tukey.

5.5 Efeito da ouabaína nos níveis de fosforilação de proteínas intracelulares de células SH-SY5Y durante infecção com o ZIKV

Para determinar quais proteínas intracelulares envolvidas no processo de infecção do ZIKV são passíveis de serem moduladas pelo tratamento com ouabaína, os níveis de fosforilação das proteínas NF-κB, mTOR, ERK, p38, SRC e AKT nas

células SH-SY5Y infectadas com o ZIKV e tratadas com ouabaína, foram determinados através de citometria de fluxo.

Em relação ao NF- κ B, o processo de infecção pelo ZIKV das SH-SY5Y (grupo ZIKV) levou a um aumento de 44% na ativação do NF- κ B quando comparado ao controle (Figura 10B), contudo, o tratamento com ouabaína (grupo ZIKV + OUA) demonstrou suprimir a ativação induzida pelo ZIKV do NF- κ B, reduzindo a ativação dessa proteína em 75% quando comparada a do grupo ZIKV (Figura 10B).

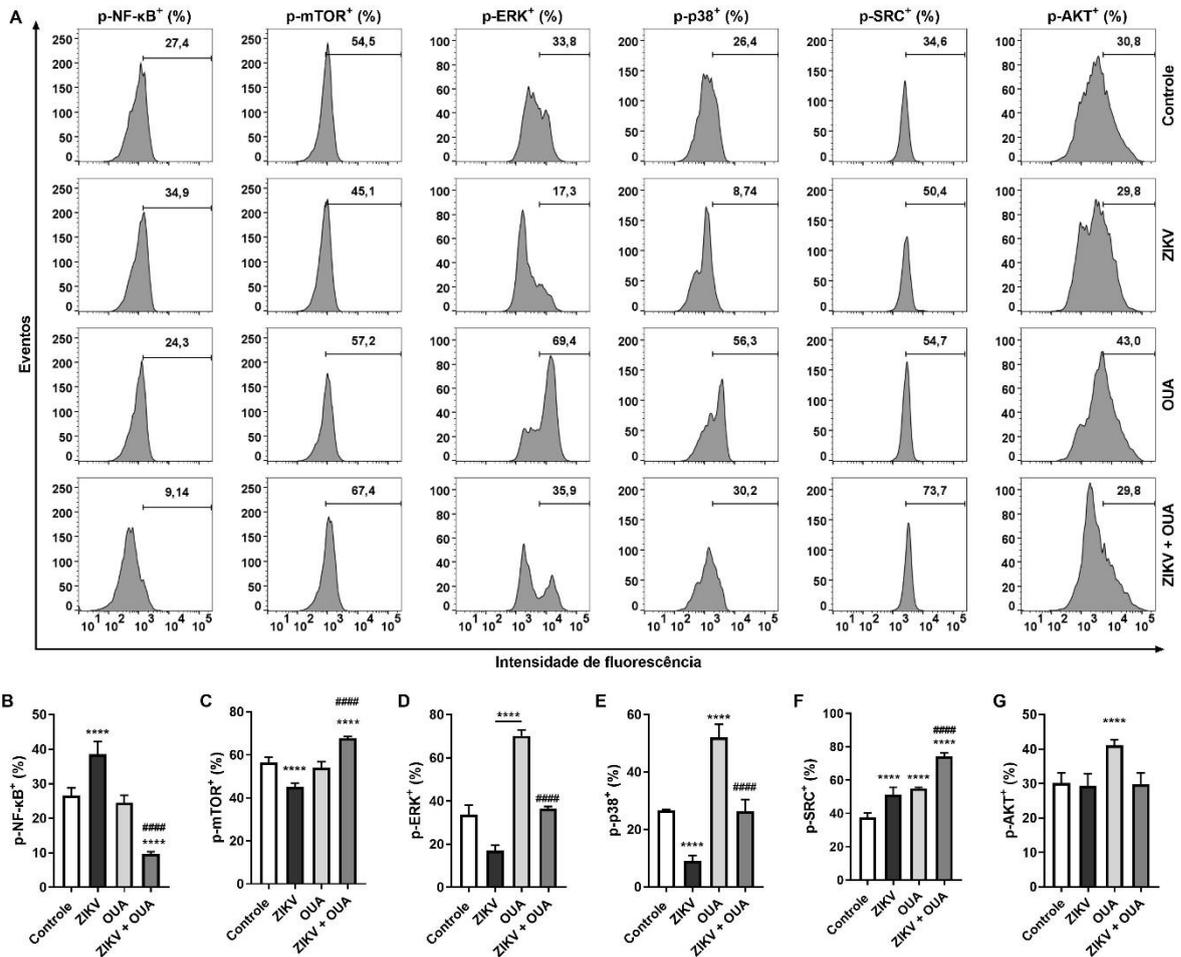
Os dados também demonstraram que a infecção pelo ZIKV de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) reduziu a fosforilação da proteína mTOR para níveis menores do que o visualizado no grupo controle (Figura 10C). Todavia, o tratamento com ouabaína das células infectadas, promoveu um aumento na fosforilação de mTOR que foi para nível acima do basal (Figura 10C) o que é um indicativo da capacidade dessa molécula em restaurar a sinalização do mTOR, outrora prejudicado pela infecção do ZIKV.

Em conjunto a isso, os resultados obtidos também demonstraram que a infecção pelo ZIKV das SH-SY5Y levou a uma redução de 50% na fosforilação da proteína ERK em relação ao grupo controle (Figura 10D), bem como uma redução de 66% na fosforilação da proteína p38 quando comparada ao grupo controle (Figura 10E). Em ambos os casos, o tratamento com ouabaína foi capaz de retomar a fosforilação de ERK e p38 para níveis basais (Figura 10D e 10E respectivamente), revertendo as modificações na ativação dessas proteínas, previamente induzidas pela infecção do ZIKV.

No que tange a ativação da proteína SRC, os dados expostos nesse trabalho sugerem que tanto a infecção com o ZIKV quanto o tratamento com ouabaína (sem estar associado a infecção do ZIKV) levaram a um aumento significativo na fosforilação de Src, quando comparado ao controle (Figura 10F). Adicionalmente, o tratamento com ouabaína das células infectadas com o ZIKV promoveu um aumento ainda maior da fosforilação de Src quando comparada a do controle (Figura 10F), sugerindo que a proteína Src é um alvo em comum para ambos ZIKV e ouabaína.

Por fim, a ouabaína não parece modular a fosforilação de AKT em células SH-SY5Y (Figura 10E), portanto, os efeitos antiviral e anti-inflamatório descritos nesse trabalho, aparentam não se relacionar com essa proteína.

Figura 10 - Efeito da ouabaína nos níveis de fosforilação de proteínas intracelulares em células SH-SY5Y durante infecção pelo ZIKV



Após 1 hora de infecção com o ZIKV PE243 (MOI: 0.1), células SH-SY5Y foram tratadas com ouabaína (18 nM) por 72 horas. Então, os histogramas de fluorescência representativos (A) e a porcentagem de p-NF-κB⁺ (B), p-mTOR⁺ (C), p-ERK⁺ (D), p-p38⁺ (E), p-SRC⁺ (F), e p-AKT⁺ (G) foram obtidos através de citometria de fluxo. Controle = SH-SY5Y não infectada e sem tratamento; ZIKV = SH-SY5Y infectada com ZIKV e sem tratamento; OUA = SH-SY5Y não infectada e tratada com ouabaína (18 nM); ZIKV + OUA = SH-SY5Y infectada com ZIKV e tratada com ouabaína (18 nM). Dados analisados utilizando FlowJo® X 10.10.0. Resultados expressos como média ± SEM de três experimentos independentes e analisados com o GraphPad Prism® versão 9, utilizando análise de variância unidirecional seguido de pós-teste de Tukey. **** = $p < 0.05$ comparado com o grupo controle; ##### = $p < 0.05$ comparado com o grupo ZIKV.

6 DISCUSSÃO

Por ser uma molécula com interação direta com a Na⁺/K⁺-ATPase levando a inibição dessa bomba, estudos envolvendo a ouabaína devem considerar os possíveis efeitos citotóxicos exercidos por essa molécula. Nesse contexto os dados de citotoxicidade *in vitro* que foram obtidos para a ouabaína nesse trabalho encontram-se de acordo com Kulikov et al. (2007) que avaliaram essa mesma molécula em células SH-SY5Y, encontrando resultados de toxicidade semelhantes. A expressiva

redução da viabilidade celular promovida pela ouabaína nas concentrações de 50 nM a 500 μ M, possivelmente relaciona-se com a inibição da Na^+/K^+ -ATPase, como já demonstrado anteriormente (Pchejetski et al., 2003). Contudo, as menores concentrações de ouabaína testadas nesse trabalho não apresentaram impacto considerável na viabilidade das SH-SY5Y, isso indica que a interação da ouabaína com a Na^+/K^+ -ATPase, nesse contexto, não está deflagrando vias de apoptose celular. Essa possibilidade permite questionamentos a respeito de quais seriam os mecanismos celulares que estão sendo modulados pela ouabaína nas menores concentrações testadas.

Essa ambiguidade da ouabaína já foi discutida e estudada em outros trabalhos, por exemplo, sabe-se que em células neurais a redução da atividade da Na^+/K^+ -ATPase pela ouabaína pode impactar negativamente o metabolismo dessas células e induzir morte neuronal. Todavia, a ouabaína pode também ocasionar benefícios para o ambiente cerebral, reduzindo a expressão de marcadores inflamatórios e relacionados ao estresse celular, a depender da concentração da molécula e do contexto biológico (Kinoshita et al., 2022).

Essa característica galgou a escolha das concentrações menos tóxicas da ouabaína para os ensaios posteriores, visando observar atividade celular não relacionada com efeitos citotóxicos.

Em relação ao efeito antiviral da ouabaína, todas as concentrações de ouabaína utilizadas no ensaio antiviral promoveram redução do título viral, porém a melhor atividade antiviral da molécula foi visualizada na concentração de 18 nM, motivo pelo qual essa concentração foi a escolhida para avaliar os possíveis efeitos imunomoduladores dessa molécula durante a infecção pelo ZIKV. A capacidade da ouabaína de interferir com a replicação viral já foi descrita para diversos vírus e em uma grande amplitude de contextos biológicos. Carvalho e colaboradores (2020) descreveram a atividade antiviral da ouabaína contra o ZIKV em células Vero, encontrando o melhor efeito antiviral na concentração de 20 nM e ao iniciar o tratamento após a ocorrência da infecção, de forma similar ao que foi realizado no presente trabalho. Já foi relatado também efeito antiviral da ouabaína contra o SARS-CoV-2 inibindo mais de 99% na replicação desse vírus, 48 horas pós infecção (Cho et al., 2020).

Além do seu efeito antiviral, a ouabaína conhecidamente é uma molécula imunomoduladora, dessa forma, o presente trabalho buscou investigar quais os

efeitos da ouabaína na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção do ZIKV de células de linhagem de neuroblastoma.

Dentre as citocinas estudadas, a infecção pelo ZIKV apenas deflagrou a produção das citocinas IL-6 e TNF- α em quantidades quantificáveis pelo método de análise empregado (ELISA sanduíche). A produção dessas citocinas ocorreu de forma dependente de tempo, com produção máxima no tempo de 72 horas pós-infecção. Tal fato possivelmente ocorreu devido a cinética de propagação intracelular do ZIKV, como descrito por Luplertlop et al. (2017), que demonstraram que em células SH-SY5Y, o título do ZIKV e a expressão de seu RNA atingem o seu máximo 72 horas após infecção. Diante disso, uma maior expressão das proteínas virais pode estar relacionada com uma resposta celular a infecção mais robusta e conseqüentemente maior produção das citocinas em questão.

Em relação aos efeitos imunomoduladores da ouabaína, o tratamento com ouabaína na concentração de 18 nM no tempo de 72 horas, modulou negativamente a produção de IL-6 e TNF- α previamente aumentados pela infecção do ZIKV. Resultados similares foram encontrados por Yang et al. (2018), os quais demonstraram que a ouabaína apresenta ação anti-inflamatória *in vitro* ao prevenir a produção exacerbada da citocina pró-inflamatória IL-6 deflagrada pelo coronavírus da gastroenterite transmissível.

A modulação na produção dessas citocinas visualizadas nesse trabalho pode ser benéfica para evitar possíveis efeitos deletérios induzidos pelo ZIKV, uma vez que já foi demonstrado que o ZIKV é capaz de aumentar a concentração de IL-6 e TNF- α no microambiente cerebral de camundongos adultos susceptíveis a infecção (*Ifnar1^{-/-}*). Esse microambiente, que também apresenta outros mediadores pró-inflamatórios, deflagra efeitos deletérios nas células cerebrais como consequência da neuroinflamação instaurada (Jeong et al., 2023). Isso corrobora com o desbalanço inflamatório que é visualizado em recém-nascidos com microcefalia induzida pela infecção do ZIKV (Vinhaes et al., 2020). Em conjunto a isso, o sêrum e o líquido cérebro-espinhal de indivíduos adultos infectados com ZIKV apresentam altas concentrações de mediadores inflamatórios (Kam et al., 2017; Carvalho et al., 2021), assim como no material placentário de mulheres infectadas com o ZIKV durante a gravidez (Rabelo et al., 2020).

Diante do exposto, percebe-se que o ZIKV promove morte celular por induzir respostas inflamatórias locais exacerbadas que geram dano tecidual, exercendo,

portanto, imunopatogenicidade. Tal característica é uma das explicações para o surgimento das principais complicações causadas pelo vírus, como a Síndrome de Guillain-Barré (GBS) e a Síndrome Congênita associada a infecção pelo vírus Zika (SCZ) (Filgueiras et al. 2021).

Portanto, a redução na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , promovidas pela ouabaína nesse trabalho, é um indício de que essa molécula, nos parâmetros de tratamento utilizados, pode diminuir a robustez das respostas inflamatórias deflagradas pelo ZIKV em células com características neuronais. Considerando a associação já exposta entre inflamação exacerbada e complicações que podem ser deflagradas pelo ZIKV, a redução na produção de citocinas inflamatórias promovida pela ouabaína que foi visualizada, tem potencial de reduzir os efeitos deletérios causados pelo ZIKV.

No organismo humano, a ativação de células da glia e de vias mediadas pelo sistema complemento, em conjunto com a síntese de mediadores inflamatórios e o recrutamento de leucócitos, são fatores chave para a inflamação cerebral. Mediante influência de fatores endógenos e exógenos como traumas e infecções crônicas, a ativação da micróglia deflagra diversas vias de transdução de sinal, incluindo as vias do fosfoinositideo 3-quinase/ proteína quinase B (PI3K/AKT), das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs) e do alvo da rapamicina de mamíferos (m-TOR), que por sua vez induzem a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). Como consequência deste processo, ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias (como IL-6 e TNF- α), quimiocinas, e enzimas induzíveis (como a sintase de óxido nítrico induzível -iNOS), que em última instância promovem a neuroinflamação (Bersano; Engele; Schäfer, 2023).

Em células cerebrais fetais, a infecção pelo ZIKV induz a produção de mediadores tipicamente encontrados durante a neuroinflamação, como IL-6 e TNF- α (Lum et al., 2017). As células da linhagem SH-SY5Y, são células de neuroblastoma humano não diferenciadas que crescem rapidamente em clusters, apresentam projeções celulares truncadas e corpos celulares robustos e são comumente utilizadas como modelo neural para investigar neurodegeneração e estresse oxidativo (Şahin et al., 2021).

Nesse trabalho, 72 horas após a infecção das SH-SY5Y pelo ZIKV, houve aumento na concentração das citocinas IL-6 e TNF- α no sobrenadante celular, porém a infecção não interferiu na produção e liberação de IL-10 e IL-1 β . Tal ocorrência está

de acordo com outros trabalhos que estudaram a resposta da linhagem SH-SY5Y mediante infecção pelo ZIKV. Lima e colaboradores (2019) avaliaram a produção de diversas citocinas pelas SH-SY5Y infectadas com o ZIKV e no mesmo tempo pós-infecção (72 horas) observaram que não houve uma produção significativa das citocinas IL-1 β e IL-10, embora tenha-se visto produção diferencial da citocina IL-6.

Dialogando com isso, estudo utilizando células SH-SY5Y com mutações que conferem alta expressão de marcadores inflamatórios, mostrou que quando essas células são cultivadas em conjunto com linhagem de micróglia humana (CHME3), ocorre uma resposta inflamatória mais robusta, levando a produção aumentada de diversos marcadores inflamatórios, a exemplo da citocina IL-1 β (Fernandes et al., 2018).

Com base nessas evidências, foram realizados os ensaios de cocultura, para averiguar se a interação de macrófagos humanos com células SH-SY5Y infectadas com ZIKV promoveria uma produção de citocinas diferente daquela encontrada apenas nas células SH-SY5Y. Além disso, buscou-se avaliar se o tratamento com ouabaína das SH-SY5Y infectadas, previamente ao estabelecimento da cocultura, modificaria de alguma forma essa produção. A partir dos resultados percebeu-se que a cocultura levou a produção de duas citocinas anteriormente não detectadas, IL-1 β e IL-10. Este resultado encontra-se de acordo com estudo de Jeong e colaboradores (2023) que demonstrou que a infecção cerebral de camundongos adultos knockouts para o receptor de interferon (*Ifnar1^{-/-}*) com o ZIKV, aumentou a expressão de IL-1 β em macrófagos infiltrantes cerebrais e induziu neuroinflamação mediada por essa citocina, o que pode ter consequências destrutivas para os tecidos do cérebro.

O sistema imune inato é capaz de detectar infecções virais através de receptores de reconhecimento de padrão, a exemplo dos receptores do tipo Toll, receptores do tipo RIG-I, Receptores do tipo NOD (NLRs) e receptores de lectina do tipo C. Os NLRs estão envolvidos na montagem de grandes complexos proteicos conhecidos como inflamassomas que participam da resposta inata a patógenos (Schroder; Tschopp, 2010).

Inflamassomas são formados por uma molécula sensora citoplasmática, como o receptor de reconhecimento de padrão do tipo NOD da família de receptores de domínio de repetição rica em leucina, membro 3 (NLRP3), uma molécula adaptadora, a exemplo da proteína semelhante a speck associada a apoptose contendo domínio de recrutamento de caspase (ASC) e uma proteína efetora (pro-Caspase-1). NLRP3

e ASC promovem clivagem de pro-caspase-1 gerando as subunidades ativas p22 e p20, que então levam a maturação e secreção de IL-1 β (Martinon; Mayor; Tschopp, 2009) responsável por induzir inflamação, promover a resposta imune adaptativa e facilitar o recrutamento de linfócitos para o local da infecção (Shrivastava et al., 2016).

A proteína NS5 do ZIKV se liga diretamente ao NLRP3 facilitando a formação do inflamassoma NLRP3 que induz a produção e liberação de IL-1 β . Essa citocina, por sua vez, contribui com a resposta inflamatória e imune do hospedeiro, sendo um dos mecanismos pelo qual o ZIKV exerce imunopatogenicidade (Wang et al., 2018).

Nesse trabalho, o tratamento com ouabaína das células de neuroblastoma infectadas com ZIKV, previamente ao estabelecimento da cocultura com macrófagos humanos, promoveu uma produção de IL-1 β similar a encontrada na cocultura de macrófagos humanos com células de neuroblastoma não infectadas. Tal fato contribui para estabelecer a capacidade que a ouabaína possui de atuar em células neurais infectadas e reduzir a inflamação mediada por macrófagos ao interagirem com essas células. Esse efeito coloca em evidência o potencial dessa molécula em proteger as células neurais infectadas com ZIKV dos efeitos deletérios da inflamação mediada por IL-1 β e pode ser um indício de uma possível modulação negativa da ativação do inflamassoma NLRP3 promovida pela ouabaína.

Em relação as vias intracelulares moduladas pela ouabaína durante infecção pelo ZIKV, no presente trabalho a ouabaína mostrou ser capaz de suprimir a ativação do NF- κ B promovida pela infecção do ZIKV. Esse resultado concorda com a regulação negativa da produção de IL-6 e TNF- α promovida pela ouabaína que foi aqui visualizada. Como demonstrado em modelos de neuroinflamação *in vitro*, NF- κ B apresenta papel crucial na indução da produção de IL-6 e TNF- α (Yang et al., 2020). Vistos em conjunto, sugere-se que a redução na fosforilação do NF- κ B mediante tratamento com ouabaína das células infectadas, pode em parte explicar a menor produção de IL-6 e TNF- α visualizada nas células infectadas com ZIKV que foram tratadas com ouabaína, sendo um indício do mecanismo na qual a ouabaína exerce seus efeitos anti-inflamatórios no contexto em questão.

Em conjunto a isso, já foi demonstrado que o alvo da Rapamicina em Mamíferos (mTOR) atua regulando diversas funções fisiológicas, incluindo sobrevivência celular, proliferação e diferenciação. Durante o desenvolvimento cerebral, as vias mediadas por mTOR atuam de forma central na manutenção da neurogênese e da pluripotência das células tronco-neurais. Anormalidades na via de sinalização do mTOR em células

tronco neurais durante o desenvolvimento cerebral, resultam em comprometimento cerebral grave (Lee, 2015), que pode ser visualizado em alguns casos de infecção pelo ZIKV (De Sales-Neto et al., 2024).

Como demonstrado por Liang et al. (2016), as proteínas NS4a e NS4b do ZIKV desregulam a sinalização do mTOR em células tronco neurais de fetos humanos, inibindo a neurogênese e induzindo autofagia. Neste contexto, esse trabalho demonstrou que a infecção causada pelo ZIKV de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) reduziu a fosforilação de mTOR, o que pode indicar prejuízos no processo de proliferação dessas células. Todavia, o tratamento com ouabaína reverteu significativamente a fosforilação de mTOR para nível acima do basal (Figura 10C) o que é um indicativo da restauração da sinalização do mTOR outrora prejudicado pela infecção do ZIKV.

Além do mTOR, já foi demonstrado que a Quinase Regulada por Sinal Extracelular (ERK) e a Quinase de Proteína Ativada por Mitógeno (MAPK): p38, regulam processos de sobrevivência celular, proliferação e diferenciação. De forma similar, os dados aqui expostos demonstram que a infecção causada pelo ZIKV levou a uma menor ativação dessas proteínas, indicando prejuízos ao processo de proliferação das células SH-SY5Y, contudo, o tratamento com ouabaína foi capaz de reverter a inibição dessas proteínas ocasionada pelo ZIKV

Diante disso, além da atividade antiviral e anti-inflamatória da ouabaína durante infecção pelo ZIKV, esses dados sugerem que essa molécula também é capaz de regular positivamente a ativação de proteínas envolvidas com a proliferação e diferenciação de células neurais, ressaltando assim o potencial da ouabaína em modular positivamente a neurogênese durante a infecção do ZIKV, que conhecidamente prejudica esse processo.

O efeito biológico clássico da ouabaína vem sendo atribuído a sua capacidade de se ligar a seu único receptor estabelecido, a Na^+/K^+ -ATPase, uma enzima de membrana que bombeia 3 íons Na^+ para o meio extracelular e 2 íons K^+ para o meio intracelular através da hidrólise de trifosfato de adenosina (Kulikov et al., 2007; Xie and Askari, 2002). Sabe-se que a ouabaína através de sua interação com a Na^+/K^+ -ATPase pode deflagrar cascatas de sinalizações intracelulares, incluindo a via da proteína quinase não receptora (NRTK) Src, o que induz uma multitude de efeitos celulares (Xie; Askari, 2002). Aqui, tanto o tratamento com ouabaína quanto a infecção do ZIKV promoveram aumento na ativação dessa proteína e o tratamento das células

infectadas levou a uma ativação ainda maior do que a visualizada na infecção e no tratamento desvinculado da infecção. Tal fato é um indicativo que tanto o tratamento com ouabaína quanto a infecção do ZIKV possuem como alvo em comum a Src, induzindo a ativação dessa proteína.

Todavia, a ativação de Src pela ouabaína pode estar relacionado com o efeito antiviral visualizado nesse trabalho, uma vez que estudo de Burkard et al. (2015), demonstrou que a atividade antiviral da ouabaína contra o coronavírus estava associado com o aumento da fosforilação de Src.

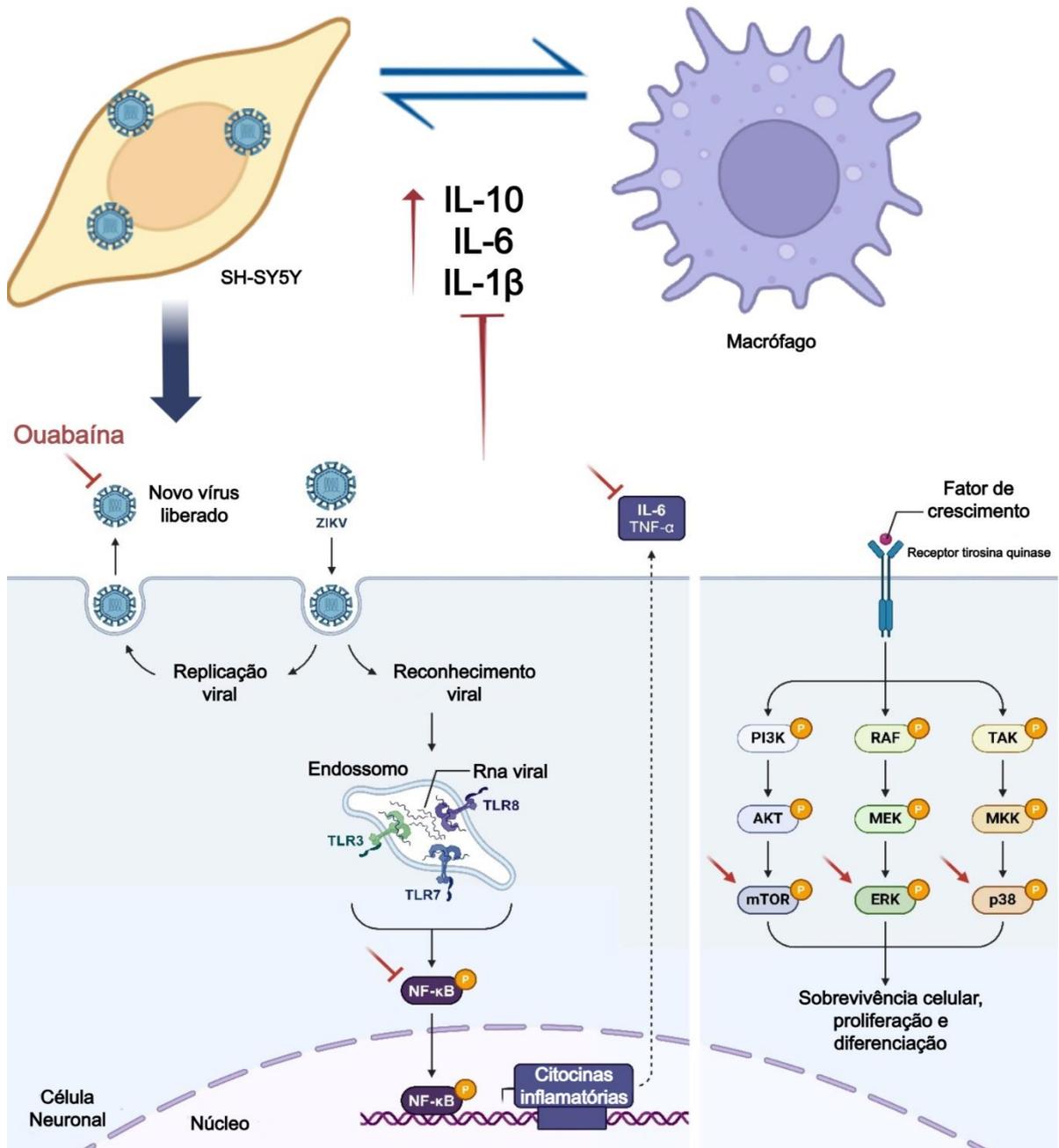
7 CONCLUSÕES

Em suma, as descobertas expostas demonstraram pela primeira vez a atividade antiviral e anti-inflamatória da ouabaína em células de linhagem neural durante a infecção pelo ZIKV. Os resultados revelaram que o tratamento com ouabaína de células SH-SY5Y infectadas com ZIKV, foi capaz de reduzir a produção de IL-6 e TNF- α , outrora aumentada pela infecção, através da supressão da ativação do NF- κ B. Em conjunto a isso, o tratamento com a ouabaína também restaurou aos níveis basais a fosforilação de mTOR, p38 e ERK que foi previamente modulada negativamente pelo ZIKV, esse efeito coloca em evidência o potencial que esta molécula apresenta em debelar processos inflamatórios deflagrados pelo ZIKV e proteger células neurais de possíveis prejuízos ao processo de neurogênese (Figura 11). Na cocultura de macrófagos humanos com células de neuroblastoma infectadas com ZIKV, observou-se aumento na produção de IL-1 β , contudo o tratamento com ouabaína foi capaz de reduzir expressivamente esta produção que retornou aos níveis obtidos na cocultura com células não infectadas (Figura 11). Esse dado evoca a possibilidade desta molécula modular negativamente a formação e ativação de inflamassoma, o que contribuiria com a robustez da atividade anti-inflamatória desta molécula, todavia, é necessário investigar especificamente este parâmetro para validação dessa hipótese.

Por fim, esse estudo contribui para confirmar a efetividade dos esteroides cardiotônicos como potenciais antivirais e agentes imunomodulatórios, sendo a ouabaína promissora contra o ZIKV. Corroborando com o que foi exposto, trabalho de Carvalho et al. de 2024 (artigo no prelo) demonstrou efeito antiviral e imunomodulatório da ouabaína em modelo *in vivo* de Síndrome Congênita do Zika. Contudo, são necessários mais estudos que investiguem outros marcadores celulares

em modelos distintos de infecção pelo ZIKV, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para melhor estabelecer os mecanismos pelo qual a ouabaína exerce seus efeitos imunomodulatórios e antiviral aqui demonstrados.

Figura 11 - Atividade antiviral e anti-inflamatória da ouabaína contra o ZIKV



Ouabaína inibe a produção de IL-6 e TNF- α induzida pelo ZIKV ao suprimir o NF- κ B, enquanto restaura a homeostase da fosforilação de mTOR, p38 e ERK na linha celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. O tratamento prévio com ouabaína das SH-SY5Y infectadas com ZIKV ainda é capaz de reduzir a produção de IL-1 β quando estas células estão em cocultura com macrófagos humanos.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, Ankita; CHAURASIA, Deepti. The expanding arms of Zika virus: An updated review with recent Indian outbreaks. **Reviews in medical virology**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2021.

Agumadu, V. C.; Ramphul, K. Zika Virus: a review of literature. **Cureus**, v. 10, n. 7, 2018.

Ahmad, F. et al. Inhibition of Neurogenesis by Zika Virus Infection. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 17, n. 2, p. 78–86, 2018.

Akera, T.; Brody, T. M. The role of Na⁺, K⁺-ATPase in the inotropic action of digitalis. **Pharmacological reviews**, n. 3, p. 187-220, 1977.

ALISSA, Mohammed; ALSUWAT, Meshari A.; ALZHRANI, Khalid J. Neurological manifestations of Flaviviridae, Togaviridae, and Peribunyaviridae as vector-borne viruses. **Reviews in medical virology**, v. 34, n. 4, p. e2571, 2024.

ALURI, Jahnavi; COOPER, Megan A.; SCHUETTPELZ, Laura G. Toll-like receptor signaling in the establishment and function of the immune system. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1374, 2021.

Amarelle, L. et al. Cardiac glycosides decrease influenza virus replication by inhibiting cell protein translational machinery. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 316, n. 6, p. L1094–L1106, 2019.

Amarelle, L.; Lecuona, E. The antiviral effects of Na,K-ATPase inhibition: A minireview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 2018.

AOUADI, Myriam et al. p38 mitogen-activated protein kinase activity commits embryonic stem cells to either neurogenesis or cardiomyogenesis. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p. 1399-1406, 2006.

ARNAUD, A. Sur la Matière Cristallisée Active, Extraite des Semences du Strophantus Glabre du Gabon. **Compt Rendus**, v. 107, p. 1162-1164, 1888.

Ashbrook, A. W. et al. Antagonism of the sodium-potassium ATPase impairs chikungunya virus infection. **mBio**, v. 7, n. 3, p. 1–14, 2016.

AUSSEL, C.; MARHABA, R.; PELASSY, C.; BREITTMAYER, J. P. Submicromolar La³⁺ concentrations block the calcium release-activated channel and impair CD69 and CD25 expression in CD3- or thapsigargin-activated Jurkat cells. **Biochem J**, v. 313 (Pt 3), p. 909-913, 1996. DOI 10.1042/bj3130909.

Barwe, S. P. et al. Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 3, p. 1082–94, 2005.

BERSANO, A.; ENGELE, J.; SCHÄFER, M. K. E. Neuroinflammation and brain disease. **BMC neurology**, v. 23, n. 1, p. 227, 2023.

BLACKHURST, Britanie M.; FUNK, Kristen E. Molecular and Cellular Mechanisms Underlying Neurologic Manifestations of Mosquito-Borne Flavivirus Infections. **Viruses**, v. 15, n. 11, p. 2200, 2023.

Blaustein, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca⁺⁺ stores and cell responsiveness. **The American Journal of Physiology**, v. 264, n. 6, p. C1367- 1387, 1993.

BLÁZQUEZ, Ana-Belén; SAIZ, Juan-Carlos. Potential for protein kinase pharmacological regulation in Flaviviridae infections. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 24, p. 9524, 2020.

BOWEN, James R. et al. Zika virus antagonizes type I interferon responses during infection of human dendritic cells. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006164, 2017.

BRODIE, Chaya et al. Ouabain induces inhibition of the progression phase in human T-cell proliferation. **Journal of cellular physiology**, v. 165, n. 2, p. 246-253, 1995.

BURKARD, Christine et al. ATP1A1-mediated Src signaling inhibits coronavirus entry into host cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 8, p. 4434-4448, 2015.

Cao-Lormeau, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.

CAO-LORMEAU, Van-Mai et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 6, p. 1085, 2014.

CAPASSO, Ariadna et al. Incidence of Guillain-Barré Syndrome (GBS) in Latin America and the Caribbean before and during the 2015–2016 Zika virus epidemic: A systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007622, 2019.

CARGNELLO, Marie; ROUX, Philippe P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 75, n. 1, p. 50-83, 2011.

Carvalho, D. C. M. et al. Antiviral and immunomodulatory effects of ouabain against Congenital Zika Syndrome model. **Molecular therapy**. Artigo no prelo.

CARVALHO, D. C. M.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; LIMA, E. A.; GALVAO, J.; ALVES, A. K. A.; FEIJO, P. R. O.; QUINTAS, L. E. M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Marinobufagenin Inhibits Neutrophil Migration and Proinflammatory Cytokines. **J Immunol Res**, v. 2019, p. 1094520, 2019. DOI 10.1155/2019/1094520.

CARVALHO, Deyse Cristina Madruga et al. Antiviral activity of ouabain against a Brazilian Zika virus strain. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 12598, 2022.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; LIMA, E. A.; CARVALHO, D. C. M.; DE SALES-NETO, J. M.; ALVES, A. K. A.; GALVAO, J.; DA SILVA, J. S. F.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain. **Front Physiol**, v. 8, p. 895, 2017. DOI 10.3389/fphys.2017.00895.

CAVALCANTE-SILVA, Luiz HA et al. Much more than a cardiotonic steroid: modulation of inflammation by ouabain. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 895, 2017.

CAVALCANTE-SILVA, Luiz Henrique Agra et al. Ouabain inhibits p38 activation in mice neutrophils. **Inflammopharmacology**, v. 29, p. 1829-1833, 2021.

CHO, Junhyung et al. Antiviral activity of digoxin and ouabain against SARS-CoV-2 infection and its implication for COVID-19. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 16200, 2020.

CORRÊA, Sônia AL; EALES, Katherine L. The role of p38 MAPK and its substrates in neuronal plasticity and neurodegenerative disease. **Journal of signal transduction**, v. 2012, n. 1, p. 649079, 2012.

CRISANTO-LÓPEZ, Israel E. et al. Congenital Zika syndrome. **Boletín médico del Hospital Infantil de México**, v. 80, n. 1, p. 3-14, 2023.

DA SILVA, Marcelo Henrique Matias et al. Innate immune response in patients with acute Zika virus infection. **Medical microbiology and immunology**, v. 208, p. 703-714, 2019.

DAI, Lianpan et al. Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 5, p. 696-704, 2016.

DANG, Jason et al. Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. **Cell stem cell**, v. 19, n. 2, p. 258-265, 2016.

DE CARVALHO, Otavio Valério et al. The thiopurine nucleoside analogue 6-methylmercaptopurine riboside (6MMP_r) effectively blocks Zika virus replication. **International journal of antimicrobial agents**, v. 50, n. 6, p. 718-725, 2017.

DE MORAES, V. L.; OLEJ, B.; DE LA ROCQUE, L.; RUMJANEK, V. M. Lack of sensitivity to ouabain in natural killer activity. **FASEB J**, v. 3, n. 12, p. 2425-2429, 1989. DOI 10.1096/fasebj.3.12.2477295.

DE OLIVEIRA, Wanderson Kleber et al. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. **The Lancet**, v. 390, n. 10097, p. 861-870, 2017.

DE SALES-NETO, José Marreiro et al. Zika virus: Antiviral immune response, inflammation, and cardiotonic steroids as antiviral agents. **International Immunopharmacology**, v. 127, p. 111368, 2024.

DE VASCONCELOS, D. I.; LEITE, J. A.; CARNEIRO, L. T.; PIUVEZAM, M. R.; DE LIMA, M. R.; DE MORAIS, L. C.; RUMJANEK, V. M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators Inflamm**, v. 2011, p. 912925, 2011. DOI 10.1155/2011/912925.

Diop, F. et al. Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–16, 2018.

Dodson, A. W. et al. Inhibitors of the sodium potassium ATPase that impair herpes simplex virus replication identified via a chemical screening approach. **Virology**, v. 366, n. 2, p. 340–348, 2007

DORNAND, J. et al. Mechanism whereby ouabain inhibits human T lymphocyte activation: effect on the interleukin 2 pathway. **Immunobiology**, v. 171, n. 4-5, p. 436-450, 1986.

Dowall, S. D. et al. Antiviral screening of multiple compounds against ebola virus. **Viruses**, v. 8, n. 11, p. 1–17, 2016.

DUFFY, Mark R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.

DUNANT, Nicolas; BALLMER-HOFER, Kurt. Signalling by Src family kinases: lessons learnt from DNA tumour viruses. **Cellular signalling**, v. 9, n. 6, p. 385-393, 1997.

DVELA, M.; ROSEN, H.; FELDMANN, T.; NESHER, M.; LICHTSTEIN, D. Diverse biological responses to different cardiotonic steroids. **Pathophysiology**, v. 14, n. 3-4, p. 159-166, 2007. DOI 10.1016/j.pathophys.2007.09.011.

Fan, X.; Xie, J.; Tian, J. Reducing Cardiac Fibrosis: Na/K-ATPase Signaling Complex as a Novel Target. **Cardiovascular pharmacology: open access**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2017.

Faria, N. R. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345-349, 2016.

FAUCI, Anthony S.; MORENS, David M. Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. **New England journal of medicine**, v. 374, n. 7, p. 601-604, 2016.

FENG, Yingqi. Recent advances in the study of zika virus structure, drug targets, and inhibitors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, p. 1418516, 2024.

FERNANDES, Adelaide et al. Secretome from SH-SY5Y APPSwe cells trigger time-dependent CHME3 microglia activation phenotypes, ultimately leading to miR-21 exosome shuttling. **Biochimie**, v. 155, p. 67-82, 2018.

FILGUEIRAS, Igor Salerno et al. The clinical spectrum and immunopathological mechanisms underlying ZIKV-induced neurological manifestations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, p. e0009575, 2021.

FOEY, Andrew D.; CRAWFORD, Aileen; HALL, Nicolas D. Modulation of cytokine production by human mononuclear cells following impairment of Na, K-ATPase activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1355, n. 1, p. 43-49, 1997.

FRANKE T.F. PI3K/Akt: getting it right matters. **Oncogene**. v. 27, p. 6473-6488, 2008.

GALVAO, J.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; CARVALHO, D. C. M.; FERREIRA, L.; MONTEIRO, T. M.; ALVES, A. F.; FERREIRA, L.; GADELHA, F.; PIUVEZAM, M. R.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. **Inflamm Res**, v. 66, n. 12, p. 1117-1130, 2017. DOI 10.1007/s00011-017-1092-9.

GALVÃO, José Guilherme Ferreira Marques et al. Ouabain modulates airway remodeling caused by Th2-high asthma in mice. **International Immunopharmacology**, v. 109, p. 108808, 2022.

GARCIA JR, Gustavo et al. Broad-spectrum antiviral inhibitors targeting pandemic potential RNA viruses. **bioRxiv**, 2023.

García-Dorival, I. et al. Elucidation of the ebola virus VP24 cellular interactome and disruption of virus biology through targeted inhibition of host-cell protein function. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 11, p. 5120–5135, 2014.

GAY, Nicholas J. et al. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 8, p. 546-558, 2014.

GIRALDO, Maria I.; GONZALEZ-OROZCO, Maria; RAJSBAUM, Ricardo. Pathogenesis of Zika virus infection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 18, n. 1, p. 181-203, 2023.

GUO, Jiao et al. Screening of natural extracts for inhibitors against Japanese encephalitis virus infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 3, p. 10.1128/aac. 02373-19, 2020.

HADDAD, Houda et al. Evaluation of the antiviral activity of new dermaseptin analogs against Zika virus. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 39, p. 101747, 2024.

HALL, M. N. mTOR—what does it do?. In: **Transplantation proceedings**. Elsevier, 2008. p. S5-S8.

HAMEL, Rodolphe et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 17, p. 8880-8896, 2015.

HAMLYN, John M. et al. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. **Clinical and experimental hypertension**, v. 20, n. 5-6, p. 523-533, 1998.

HILGENFELD, Rolf; LEI, Jian; ZHANG, Linlin. The Structure of the Zika Virus Protease, NS2B/NS3 pro. **Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies**, p. 131-145, 2018.

Hoffmann, H. H.; Palese, P.; Shaw, M. L. Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. **Antiviral Research**, v. 80, n. 2, p. 124–134, 2008.

HU, Tao et al. The key amino acids of E protein involved in early flavivirus infection: Viral entry. **Virology journal**, v. 18, n. 1, p. 136, 2021.

Islam, M. T. et al. Natural products and their derivatives against coronavirus: A review of the non-clinical and pre-clinical data. **Phytotherapy Research**, v.34, p. 2471-2492, 2020.

JACOB, P. L. et al. Immunomodulatory activity of ouabain in Leishmania leishmania amazonensis-infected Swiss mice. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1313-1321, 2013.

JENSEN, P.; WINGER, L.; RASMUSSEN, H.; NOWELL, P. The mitogenic effect of A23187 in human peripheral lymphocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 496, n. 2, p. 374-383, 1977. DOI 10.1016/0304-4165(77)90320-8.

JEONG, Gi Uk et al. Zika virus infection induces interleukin-1 β -mediated inflammatory responses by macrophages in the brain of an adult mouse model. **Journal of Virology**, v. 97, n. 6, p. e00556-23, 2023.

JOHANSSON, Michael A. et al. Zika and the risk of microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 1, p. 1-4, 2016.

KAM, Yiu-Wing et al. Specific biomarkers associated with neurological complications and congenital central nervous system abnormalities from Zika virus–infected patients in Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. 2, p. 172-181, 2017.

Kapoor, A. et al. Human cytomegalovirus inhibition by cardiac glycosides: Evidence for involvement of the hERG gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4891–4899, 2012.

KARKHAH, Ahmad et al. Zika virus: epidemiology, clinical aspects, diagnosis, and control of infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, p. 2035-2043, 2018.

Kasprzykowski, J. I. et al. A recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there a risk of a new epidemic? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 96, p. 579–581, 2020.

KAWASAKI, Takumi; KAWAI, Taro. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 461, 2014.

KIM, Eun Kyung; CHOI, Eui-Ju. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. **Archives of toxicology**, v. 89, p. 867-882, 2015.

KIM, Eun Kyung; CHOI, Eui-Ju. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 4, p. 396-405, 2010.

KINOSHITA, Paula Fernanda et al. The Janus face of ouabain in Na⁺/K⁺-ATPase and calcium signalling in neurons. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 8, p. 1512-1524, 2022.

KULIKOV, Andrey et al. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 7, p. 1691-1702, 2007.

LAWRENCE, Toby. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. a001651, 2009.

LEE, Da Yong. Roles of mTOR signaling in brain development. **Experimental neurobiology**, v. 24, n. 3, p. 177, 2015.

LEITE, J. A.; ALVES, A. K.; GALVAO, J. G.; TEIXEIRA, M. P.; CAVALCANTE-SILVA, L. H.; SCAVONE, C.; MORROT, A.; RUMJANEK, V. M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Ouabain Modulates Zymosan-Induced Peritonitis in Mice. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 265798, 2015. DOI 10.1155/2015/265798.

LEITE, Jacqueline Alves et al. Atividade imunomoduladora da ouabaína no processo inflamatório agudo. 2012.

LEITE, Jacqueline Alves et al. Neuroinflammation and neutrophils: modulation by ouabain. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 824907, 2022.

Liang, M. et al. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. **The Journal Biological Chemistry**, v. 282, n. 14, p. 10585–10593, 2007.

LIANG, Qiming 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.

LIMA, Morganna C. et al. The transcriptional and protein profile from human infected neuroprogenitor cells is strongly correlated to Zika virus microcephaly cytokines phenotype evidencing a persistent inflammation in the CNS. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1928, 2019.

Liu, L. Role of caveolae in ouabain-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells of the synthetic phenotype. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 5, p. H2173–H2182, 2004.

LUM, Fok-Moon et al. Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 7, p. 914-920, 2017.

LUPLERTLOP, Natthanej et al. The impact of Zika virus infection on human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. **Journal of vector borne diseases**, v. 54, n. 3, p. 207-214, 2017.

MARBÁN-CASTRO, Elena et al. Zika virus infection in pregnant women and their children: A review. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 265, p. 162-168, 2021.

Marques, V. M. et al. Neurological Complications of Congenital Zika Virus Infection. **Pediatric Neurology**, v. 91, p. 3–10, 2019.

MARTINA, Byron EE; KORAKA, Penelope; OSTERHAUS, Albert DME. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 4, p. 564-581, 2009.

MARTINON, Fabio; MAYOR, Annick; TSCHOPP, Jürg. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual review of immunology**, v. 27, n. 1, p. 229-265, 2009.

MASMEJAN, Sophie et al. Zika virus. **Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 898, 2020.

MATSUMORI, A.; ONO, K.; NISHIO, R.; IGATA, H.; SHIOI, T.; MATSUI, S.; FURUKAWA, Y.; IWASAKI, A.; NOSE, Y.; SASAYAMA, S. Modulation of cytokine production and protection against lethal endotoxemia by the cardiac glycoside ouabain. **Circulation**, v. 96, n. 5, p. 1501-1506, 1997. DOI 10.1161/01.cir.96.5.1501.

MEDZHITOV, Ruslan. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 2, p. 135-145, 2001.

MEERTENS, Laurent 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.

MESSMER, Kirsten; REYNOLDS, Gavin P. An in vitro model of inflammatory neurodegeneration and its neuroprotection. **Neuroscience letters**, v. 388, n. 1, p. 39-44, 2005.

Mi, S. F. et al. Na⁺/K⁺-ATPase β 1 subunit interacts with M2 proteins of influenza A and B viruses and affects the virus replication. **Science China Life Sciences**, v. 53, n. 9, p. 1098–1105, 2010.

MIRZA, Muhammad Usman et al. The discovery of Zika virus NS2B-NS3 inhibitors with antiviral activity via an integrated virtual screening approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 175, p. 106220, 2022.

MIRZAA, Ghayda M.; RIVIÈRE, JEAN-BAPTISTE; DOBYNS, William B. Megalencephaly syndromes and activating mutations in the PI3K-AKT pathway: MPPH and MCAP. In: **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**. 2013. p. 122-130.

MOGENSEN, Knud E. et al. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 19, n. 10, p. 1069-1098, 1999.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MULGAONKAR, Nirmitee et al. Druggability assessment of precursor membrane protein as a target for inhibiting the Zika virus. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 8, p. 3508-3524, 2022.

MUSSO, Didier; KO, Albert I.; BAUD, David. Zika virus infection—after the pandemic. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 15, p. 1444-1457, 2019.

MWALIKO, Caroline et al. Zika virus pathogenesis and current therapeutic advances. **Pathogens and Global Health**, v. 115, n. 1, p. 21-39, 2021.

NASCIMENTO-CARVALHO, Gustavo C. et al. Zika-exposed microcephalic neonates exhibit higher degree of inflammatory imbalance in cerebrospinal fluid. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 8474, 2021.

NELLIST, Mark et al. Germline activating AKT3 mutation associated with megalencephaly, polymicrogyria, epilepsy and hypoglycemia. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 114, n. 3, p. 467-473, 2015.

NEUFELDT, Christopher J. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 125-142, 2018.

OEHLER, Erwan et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 9, p. 20720, 2014.

OLEJ, Beni et al. Effect of ouabain on lymphokine-activated killer cells. **International journal of immunopharmacology**, v. 16, n. 9, p. 769-774, 1994.

ORIGLIA, Nicola et al. MAPK, β -amyloid and synaptic dysfunction: the role of RAGE. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 9, n. 11, p. 1635-1645, 2009.

OSHIUMI, Hiroyuki et al. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- β induction. **Nature immunology**, v. 4, n. 2, p. 161-167, 2003.

PCHEJETSKI, Dimitri et al. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by ouabain triggers epithelial cell death independently of inversion of the [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 301, n. 3, p. 735-744, 2003.

PERERA, Dayangi R. et al. Roles of NS1 Protein in flavivirus pathogenesis. **ACS Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 20-56, 2023.

PIELNAA, Paul et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, v. 543, p. 34-42, 2020.

PIERSON, Theodore C.; DIAMOND, Michael S. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. **Nature**, v. 560, n. 7720, p. 573-581, 2018.

PIRES, V.; HARAB, R. C.; OLEJ, B.; RUMJANEK, V. M. Ouabain effects on activated lymphocytes: augmentation of CD25 expression on TPA-stimulated cells and of CD69 on PHA-and TPA-stimulated cells. **Int J Immunopharmacol**, v. 19, n. 3, p. 143-148, 1997. DOI 10.1016/s0192-0561(96)00070-7.

QUINTANA, Verónica Mara et al. Antiviral activity of the natural alkaloid anisomycin against dengue and Zika viruses. **Antiviral research**, v. 176, p. 104749, 2020.

RABELO, Kíssila et al. Zika induces human placental damage and inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 2146, 2020.

RAY, E.; SAMANTA, A. K. Receptor-mediated endocytosis of IL-8: a fluorescent microscopic evidence and implication of the process in ligand-induced biological response in human neutrophils. **Cytokine**, v. 9, n. 8, p. 587-596, 1997. DOI 10.1006/cyto.1997.0206.

REDONDO, J. M.; LOPEZ RIVAS, A.; FRESNO, M. Activation of the Na⁺/K⁺-ATPase by interleukin-2. **FEBS Lett**, v. 206, n. 2, p. 199-202, 1986. DOI 10.1016/0014-5793(86)80980-2.

RODRIGUES MASCARENHAS, S.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERNANDES DOS SANTOS, N.; RUMJANEK, V. M. CD69 expression induced by thapsigargin, phorbol ester and ouabain on thymocytes is dependent on external Ca²⁺ entry. **Life Sci**, v. 73, n. 8, p. 1037-1051, 2003. DOI 10.1016/s0024-3205(03)00377-1.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; DA SILVA DE OLIVEIRA, A.; AMOEDO, N. D.; AFFONSO-MITIDIARI, O. R.; RUMJANEK, F. D.; RUMJANEK, V. M. Modulation of the immune system by ouabain. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1153, p. 153-163, 2009. DOI 10.1111/j.1749-6632.2008.03969.x.

RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; DOS SANTOS, N. F.; RUMJANEK, V. M. Synergistic effect between ouabain and glucocorticoids for the induction of thymic atrophy. **Biosci Rep**, v. 26, n. 2, p. 159-169, 2006. DOI 10.1007/s10540-006-9012-1.

REED, Lowell Jacob; MUENCH, Hugo. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. 1938.

ROSEN, Anders; MORAN, Neil C. Comparison of the action of ouabain on the heart in hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid dogs. **Circulation Research**, v. 12, n. 5, p. 479-486, 1963.

ROSKOSKI JR, Robert. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. **Pharmacological research**, v. 94, p. 9-25, 2015.

ROTHAN, Hussin A. et al. Zika virus and the metabolism of neuronal cells. **Molecular neurobiology**, v. 56, n. 4, p. 2551-2557, 2019.

ŞAHİN, Meryem et al. Transformation of SH-SY5Y cell line into neuron-like cells: Investigation of electrophysiological and biomechanical changes. **Neuroscience Letters**, v. 745, p. 135628, 2021.

SAMUEL, Charles E. Antiviral actions of interferons. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 778-809, 2001.

SANTOS, Camilla Natália Oliveira et al. Association between genetic variants in TREM1, CXCL10, IL4, CXCL8 and TLR7 genes with the occurrence of congenital Zika syndrome and severe microcephaly. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 3466, 2023.

SATO, Shintaro et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF- κ B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 8, p. 4304-4310, 2003.

Schoner, W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 10, p. 2440–2448, 2002.

Schoner, W. Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 108, n. 7, p. 449-54, 2000.

SCHRODER, Kate; TSCHOPP, Jurg. The inflammasomes. **cell**, v. 140, n. 6, p. 821-832, 2010.

SCHULZ, Daniel et al. In-depth characterization of monocyte-derived macrophages using a mass cytometry-based phagocytosis assay. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1925, 2019.

SEKARAN, Shamala Devi et al. Host immune response against DENV and ZIKV infections. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 975222, 2022.

SERMAN, Taryn M.; GACK, Michaela U. Evasion of innate and intrinsic antiviral pathways by the Zika virus. **Viruses**, v. 11, n. 10, p. 970, 2019.

SHAH, Priya S. et al. Comparative flavivirus-host protein interaction mapping reveals mechanisms of dengue and Zika virus pathogenesis. **Cell**, v. 175, n. 7, p. 1931-1945. e18, 2018.

Shatzmann, H. J. Cardiac glycosides as inhibitors of active potassium and sodium transport by erythrocyte membrane. **Helvetica Physica Acta**, v.11, n. 4, p. 346-360, 1953.

SHRIVASTAVA, Gaurav et al. Inflammasomes and its importance in viral infections. **Immunologic research**, v. 64, p. 1101-1117, 2016.

SIROHI, Devika; KUHN, Richard J. Zika virus structure, maturation, and receptors. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl_10, p. S935-S944, 2017.

SUN, Yu et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 35, n. 6, p. 600-604, 2015.

SURYA, Wahyu; HONEY, Shwe Sin; TORRES, Jaume. Flavivirus Zika NS4A protein forms large oligomers in liposomes and in mild detergent. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 12533, 2024.

SZAMEL, M.; LEUFGEN, H.; KURRLE, R.; RESCH, K. Differential signal transduction pathways regulating interleukin-2 synthesis and interleukin-2 receptor expression in stimulated human lymphocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1235, n. 1, p. 33-42, 1995. DOI 10.1016/0005-2736(94)00297-3.

SZAMEL, Marta; SCHNEIDER, Siegfried; RESCH, K. Functional interrelationship between (Na⁺⁺ K⁺)-ATPase and lysolecithin acyltransferase in plasma membranes of mitogen-stimulated rabbit thymocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 256, n. 17, p. 9198-9204, 1981.

TEIXEIRA, M. P.; RUMJANEK, V. M. Ouabain affects the expression of activation markers, cytokine production, and endocytosis of human monocytes. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 760368, 2014. DOI 10.1155/2014/760368.

VALENTE, R. C.; NASCIMENTO, C. R.; ARAUJO, E. G.; RUMJANEK, V. M. mCD14 expression in human monocytes is downregulated by ouabain via transactivation of epithelial growth factor receptor and activation of p38 mitogen-activated protein kinase. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 4, p. 228-236, 2009. DOI 10.1159/000212383.

VINHAES, Caian L. et al. Newborns with Zika virus-associated microcephaly exhibit marked systemic inflammatory imbalance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 4, p. 670-680, 2020.

WANG, Boxiao et al. Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. **Cellular and molecular life sciences**, v. 75, p. 1723-1736, 2018.

Wang, J. et al. Zika virus infected primary microglia impairs NPCs proliferation and differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 497, n. 2, p. 619–625, 2018.

WANG, Wenbiao et al. Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 β secretion. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 106, 2018.

Wang, X. Apoptotic insults impair Na⁺, K⁺-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. **Journal of cell science**, v. 116, n. 10, p. 2099-2110, 2003.

WARD, P. A.; BECKER, E. L. Potassium reversible inhibition of leukotaxis by ouabain. **Life Sci**, v. 9, n. 6, p. 355-360, 1970. DOI 10.1016/0024-3205(70)90180-3.

XIE, Xiaochun; ZENG, Jianxiong. Neuroimmune evasion of Zika virus to facilitate viral pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 662447, 2021.

XIE, Zijian; ASKARI, Amir. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. **European journal of biochemistry**, v. 269, n. 10, p. 2434-2439, 2002.

YANG, Cheng-Wei et al. The cardenolide ouabain suppresses coronaviral replication via augmenting a Na⁺/K⁺-ATPase-dependent PI3K_PDK1 axis signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 356, p. 90-97, 2018.

YANG, Lei et al. Neuroprotection by dihydrotestosterone in LPS-induced neuroinflammation. **Neurobiology of Disease**, v. 140, p. 104814, 2020.

Yoon, K. J. et al. Zika-Virus-Encoded NS2A Disrupts Mammalian Cortical Neurogenesis by Degrading Adherens Junction Proteins. **Cell Stem Cell**, v. 21, n. 3, p. 349- 358.e6, 2017.

ZHANG, Xingcui et al. Structure and function of capsid protein in flavivirus infection and its applications in the development of vaccines and therapeutics. **Veterinary research**, v. 52, p. 1-14, 2021.

Anexo 1 – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Participação no estudo

O(a) senhor(a) está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Atividade anti-inflamatória da ouabaina na cocultura de macrófagos humanos e células de linhagem de neuroblastoma humano infectadas com zika vírus” coordenada por Daniel Wilson Arruda Magalhães. O objetivo deste estudo é avaliar a atividade anti-inflamatória da ouabaina na cocultura de macrófagos humanos e células de linhagem de neuroblastoma humano infectadas com zika vírus. Neste projeto, as células do seu sangue, os monócitos, serão diferenciados em macrófagos e utilizados para investigarmos sua interação com células que foram infectadas pelo zika vírus e tratadas ou não com a ouabaina. Caso o(a) senhor(a) aceite participar, terá que doar uma única vez uma amostra de 20mL de sangue que será coletada do seu braço. O sangue será mantido no Laboratório de Biologia Molecular (Labimol), no Centro de Ciências Médicas da UFPB e será armazenado em geladeira por até 6 horas antes do processamento para a separação das células (glóbulos brancos) do sangue. Depois os glóbulos brancos serão cultivados e os que aderirem na placa de cultivo serão mantidos por uma semana, os que aderem na placa são em maioria monócitos, um tipo de glóbulo branco que pode ser diferenciado in vitro em macrófagos que é um tipo de célula envolvido na resposta imune. Assim, seus monócitos serão mantidos em cultura celular por uma semana na presença de estímulos para que se diferenciem em macrófagos. Os macrófagos serão utilizados em cocultura com células de neuroblastoma infectadas com zika vírus que foram tratadas ou não com ouabaina, para avaliar a ação da ouabaina nas células infectadas e como isso interfere na resposta inflamatória mediada pela ação destes macrófagos. Também pesquisaremos se seus macrófagos são capazes de reconhecer e remover células de neuroblastoma infectadas pelo vírus Zika e como a ouabaina irá interferir neste processo. Este processo de englobar e remover células mortas ou infectadas é chamado de eferocitose. Quando os macrófagos englobam células infectadas ou apoptóticas, eles podem se ativar e por isso investigaremos se os macrófagos ativados pelas células infectadas tratadas ou não com ouabaina terão a produção de proteínas chamadas citocinas moduladas (IL-1 β , IL-6 e IL-10 são as citocinas que serão estudadas nesta pesquisa). Citocinas são proteínas mensageiras do sistema imune, envolvidas por exemplo em processos de inflamação e reparo dos tecidos no nosso corpo. Também será analisado a formação de inflamassoma pelos seus macrófagos ao entrarem em contato com células de neuroblastoma infectadas com zika vírus, tratadas ou não com ouabaina, para determinar se a ouabaina é capaz de interferir na resposta inflamatória do macrófago. Para averiguar como a ouabaina potencialmente modula este processo inflamatório observado na interação dos seus macrófagos com o neuroblastoma infectado, serão analisados os níveis de fosforilação das MAPK, (ERK, JNK e p38

1/4

serão as MAPKs estudadas nesta pesquisa) dos macrófagos em contato ou não com as células de neuroblastoma infectadas com o zika vírus, que foram tratadas ou não com ouabaina. Durante o tempo de realização desta pesquisa os macrófagos e o sobrenadante das culturas poderão ser congelados e armazenados em ultrafreezer até a realização de todas as análises, experimentos e descarte. Após a coleta do seu sangue, a parte que não for utilizada nos experimentos (os glóbulos vermelhos) e mesmo a parte que for utilizada nos experimentos e análises desta pesquisa, assim como os sobrenadantes de cultura, serão descartados ao fim da pesquisa. Para isso serão primeiramente autoclavados (processo de esterilização), depois descartados em lixo biológico e por fim destinado à incineração, conforme as normas vigentes. O(a) senhor(a) também responderá a um questionário, que levará em torno de 10 minutos, no qual perguntaremos sua idade, peso, altura, se possui alguma doença, se faz uso de alguma medicação, se é fumante, se faz uso de bebidas alcoólicas ou drogas ilícitas, se está grávida ou amamentando.

Riscos e Benefícios

Com sua participação nesta pesquisa, o(a) senhor(a) estará exposto(a) a desconforto no momento da coleta sanguínea e possibilidade de formação de hematoma dolorido no local da coleta. A coleta será feita utilizando-se de seringa e agulha descartáveis e estéreis. Posteriormente o sangue será transferido para tubos fechados contendo heparina sódica (anticoagulante). A coleta será feita por profissionais treinados com experiência no protocolo de coleta sanguínea.

Além disso, a aplicação do questionário pode gerar constrangimento ao se perguntar sobre estilo de vida e estado de saúde do indivíduo, neste ponto, o pesquisador estará comprometido em manter o respeito e a descrição, prevenindo assim o constrangimento. Os pesquisadores serão os únicos com acesso aos dados obtidos, mantendo-os em sigilo.

Como benefício, você irá indiretamente contribuir com a descoberta de uma nova aplicação para molécula ouabaina, que potencialmente poderá ser utilizada no tratamento da inflamação aguda e crônica que é observada na infecção pelo zika vírus.

Sigilo, Anonimato e Privacidade

Os dados obtidos com esta pesquisa podem ser publicados em aulas, congressos, eventos científicos, palestras ou periódicos científicos, sem a sua identificação. Os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e confidencialidade dos dados, bem como a não exposição individualizada dos dados da pesquisa. Sua participação é voluntária e você terá a liberdade de se recusar a responder quaisquer questões que lhe ocasionem constrangimento de alguma natureza.

Autonomia

O(a) senhor(a) tem a autonomia de retirar-se da pesquisa a qualquer momento ou recusar a participação, e isto não acarretará qualquer prejuízo a você. Durante toda a pesquisa, você terá garantia de livre acesso a todas as informações e esclarecimentos a respeito do estudo e de suas consequências. Se durante a pesquisa for detectado que você apresenta alguma condição que evoque necessidade de tratamento, receberá a orientação da equipe de pesquisa, de forma a adquirir um atendimento especializado. O(a) senhor(a) também poderá contatar os pesquisadores em qualquer etapa da pesquisa, por e-mail ou telefone, a partir dos contatos dos pesquisadores que constam no final do documento.

Devolutiva dos resultados

Os resultados da pesquisa poderão ser solicitados a partir de novembro de 2025, mediante solicitação será endereçado um e-mail para você, descrevendo os resultados obtidos na pesquisa. Ressalta-se que os dados coletados somente poderão ser utilizados para as finalidades da presente pesquisa, sendo que para novos objetivos um novo TCLE deve ser aplicado.

Ressarcimento e Indenização

Sua participação é voluntária, portanto não poderá ser pago por participar desta pesquisa. De forma equivalente, sua participação na pesquisa não implica em gastos para você. Caso haja algum dano decorrente da sua participação na pesquisa, você será indenizado, conforme determina a lei.

Mediante esclarecimento a respeito da pesquisa, caso você aceite fazer parte do estudo, deverá assinar o consentimento de participação em todas as páginas e no campo previsto para o seu nome, que é impresso em duas vias, uma delas ficará em posse do pesquisador responsável e a outra via com você.

Consentimento de Participação

Eu _____ concordo em participar, voluntariamente da pesquisa intitulada "Atividade anti-inflamatória da ouabaina na cocultura de macrófagos humanos e células de linhagem de neuroblastoma humano infectadas com zika vírus" conforme informações contidas neste TCLE.

Local e data: _____



Impressão
datiloscópica do
participante

Assinatura do Participante da Pesquisa: _____

Pesquisador (a) responsável: Daniel Wilson Arruda Magalhães

E-mail para contato: daniel.magalhaes.biotec@gmail.com

Telefone para contato: (83) 981627505

Assinatura do (a) pesquisador (a) responsável: _____

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante sejam respeitados, sempre se pautando pelas Resoluções 466/12 e 510/16 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). O CEP tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Caso você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o Contato do pesquisador responsável ou com o Comitê de Ética do Centro de Ciências Médicas

Endereço:- Centro de Ciências Médicas, 3º andar, Sala 14, Campus I - Cidade Universitária - Bairro

Castelo Branco CEP: 58059-900 - João Pessoa-PB

Telefone: (083) 3216-7308

E-mail: comitedeetica@ccm.ufpb.br

Anexo 2 – Aprovação CEP

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
MÉDICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA / CCM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade anti-inflamatória da ouabaina na cocultura de macrófagos humanos e células de linhagem de neuroblastoma humano infectadas com zika vírus

Pesquisador: DANIEL WILSON ARRUDA MAGALHAES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 74320323.2.0000.8069

Instituição Proponente: UFPB - Centro de Ciências Médicas/CCM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.543.849

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 30 de Novembro de 2023

Assinado por:
MARCIA ADRIANA DIAS MEIRELLES MOREIRA
(Coordenador(a))

Anexo 3 – Artigo publicado em tema correlato a dissertação



International Immunopharmacology

Volume 127, 25 January 2024, 111368



Zika virus: Antiviral immune response, inflammation, and cardiotoxic steroids as antiviral agents

José Marreiro de Sales-Neto, Deyse Cristina Madruga Carvalho, Daniel Wilson Arruda Magalhães, Anna Beatriz Araujo Medeiros, Mariana Mendonça Soares, Sandra Rodrigues-Mascarenhas  

Show more 

 Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.111368> 

[Get rights and content](#) 

Anexo 4 – Artigo submetido relacionado a dissertação.

Ouabain presents antiviral and anti-inflammatory activity against Zika virus in a human neural cell line

José Marreiro de Sales-Neto (ORCID: 0000-0002-4591-0441)^a, Daniel Wilson Arruda Magalhães (ORCID: 0000-0003-2198-1867)^a, Deyse Cristina Madruga Carvalho (ORCID: 0000-0002-6987-262X)^a, Sandra Rodrigues-Mascarenhas (ORCID: 0000-0003-4192-7382)^{a*}

^a *Laboratory of Immunobiotechnology, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, BR.*

* *Correspondence: Laboratory of Immunobiotechnology, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, BR, CEP: 58051-900. E-mail: sandra@cbiotec.ufpb.br.*

