

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PRISCILA GRAZIELI LOPES

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROMOVIDAS PELA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA ZIKA EM CULTURAS PRIMÁRIAS
DE CÉLULAS DA GLIA**

BELO HORIZONTE

2019

PRISCILA GRAZIELI LOPES

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROMOVIDAS PELA
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA ZIKA EM CULTURAS PRIMÁRIAS
DE CÉLULAS DA GLIA**

Versão final

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) como requisito para obtenção do título de mestre em Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Juliana A. Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabíola M. Ribeiro

BELO HORIZONTE

2019

043

Lopes, Priscila Grazieli.

Avaliação das alterações promovidas pela infecção pelo vírus da Zika em culturas primárias de células da glia [manuscrito] / Priscila Grazieli Lopes. – 2019.

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

Orientadora: Profa. Dra. Juliana A. Silva. Co-orientadora: Profa. Dra. Fabíola M. Ribeiro.

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

1. Neurociências. 2. Infecção por Zika virus. 3. Neuroglia. 4. Fator de Necrose Tumoral alfa. 5. Interleucina-1beta. I. Silva, Juliana A. II. Ribeiro, Fabíola Mara. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA PRISCILA GRAZIELI LOPES

Realizou-se, no dia 07 de fevereiro de 2020, às 09:00 horas, Sala de Seminários - Bloco G4 do ICB/UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 182ª defesa de dissertação, intitulada *Avaliação das alterações promovidas pela infecção pelo vírus da Zika em culturas primárias de células da glia.*, apresentada por PRISCILA GRAZIELI LOPES, número de registro 2017717864, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Juliana Alves da Silva - Orientadora (UFMG), Prof(a). Fabiola Mara Ribeiro (UFMG), Prof(a). Alvaro Gil Araujo Ferreira (Fiocruz), Prof(a). Luciene Bruno Vieira (UFMG).

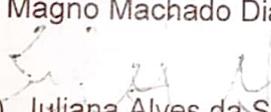
A Comissão considerou a dissertação:

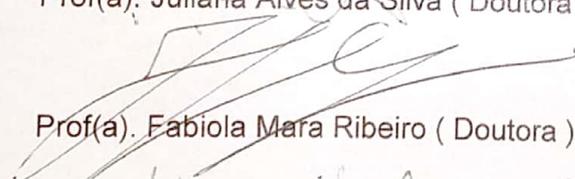
Aprovada

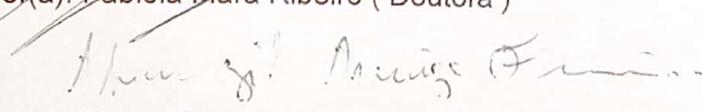
Reprovada

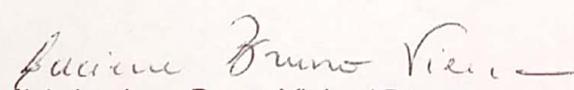
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 07 de fevereiro de 2020.

Carlos Magno Machado Dias - Secretário(a)


Prof(a). Juliana Alves da Silva (Doutora)


Prof(a). Fabiola Mara Ribeiro (Doutora)


Prof(a). Alvaro Gil Araujo Ferreira (Doutor)


Prof(a). Luciene Bruno Vieira (Doutora)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer Aquele que me deu o dom da vida, que é o centro de todo o meu ser e que é digno de toda honra e glória, obrigada Deus.

Também quero fazer um grande agradecimento à minha família. Palavras não podem expressar minha gratidão por seu apoio. Agradeço aos meus pais Hugo e Patrícia, a minha irmã Pâmela, ao meu cunhado Oliver e a minha sobrinha Svea Marie. Foram inúmeros os sacrifícios feitos por vocês a fim de que eu pudesse me tornar quem sou. Ainda mais impressionante é a persistência de vocês nos valores corretos, além de todo investimento e motivação.

Antes de mais, gostaria de mostrar o meu maior apreço às professoras Juliana Alves-Silva e Fabíola Ribeiro, pelo apoio ilimitado e contínuo em várias frentes ao longo desse projeto. Obrigada pela orientação, pelo feedback construtivo e enriquecedor, pelas sugestões valiosas e pelo tempo gasto no ensino e correção.

É relevante salientar que minhas realizações gerais são o produto de uma interação frutífera com pessoas diversas e muito especiais, que me ajudaram a alcançar meu potencial e realizar esse marco. É, portanto, um prazer expressar minha mais calorosa gratidão aqueles com quem tive a sorte de conhecer e trabalhar, obrigada Laboratório de Neurobioquímica (Toniana, Jéssica, Pablo, Izabella Bárbara, Emanuelle, Thiago Araújo, Esther, Natália) e Laboratório RNAi (Juliana Armache, Thiago Jiran, Isaque, Siad, Mathias, Flávia, Ezequiel, João Paulo, Elisa e Prof. João Marques)

Além disso, também não posso deixar de agradecer aos meus amigos de Ouro Preto Regina, Fernanda, Laís, aos irmãos da República Cêkisabi, aos professores Alexandre Silva e Cristiano Schettini. Aos meus amigos Aliançados Mariana, Hadassa, Pedro, Elisa, Samuel e Karen. Aos meus eternos parceiros de ballet Marcone e Déborah. Não poderia sequer me esquecer dos companheiros de ciência Ana Luiza Campos, Mariana Aganetti, Allysson Cramer, Matheus Lavinge, Thiago, Lucio e César Caldeira.

Agradeço ao PPG em Neurociências da UFMG, aos professores colaboradores e as agências fomentadoras por essa oportunidade incomensurável de expandir meu conhecimento.

RESUMO

Infecções neuronais pelo vírus da Zika (ZIKV) têm sido objeto de várias pesquisas nos últimos anos, onde diversos estudos buscam elucidar a correlação entre a infecção por este vírus e síndromes neurológicas, tais como, microcefalia e Guillain Barré. Um recente trabalho do nosso grupo (Olmo et al., 2017) revelou que infecções por ZIKV induzem processos não autônomos de morte neuronal, *in vitro*, que por sua vez parecem ser regulados por citocinas pró-inflamatórias e sinalização via glutamato. É importante ressaltar que esses resultados foram realizados em culturas predominantemente neuronais onde pouquíssima ou nenhuma contribuição de astrócitos e micróglia foram encontrados. Devido ao papel crucial de células da glia no metabolismo de neurotransmissores e regulação de processos inflamatórios no cérebro, o presente estudo tem o propósito de investigar o efeito da infecção por ZIKV em culturas primárias de células da glia e a participação de fatores liberados por estas culturas em processos relacionados a morte neuronal. Diferentes aspectos de resposta celular foram avaliados em culturas primárias de células da glia infectadas com ZIKV por 24 e 48 horas, tais como, carga viral, proliferação de micróglia e alterações de expressão gênica de genes específicos. Nossas análises detectaram carga viral nos tempos de 24 e 48 horas pós infecção, demonstrando que o ZIKV é capaz de infectar células da glia em culturas primárias, o que nos forneceria uma opção de modelo *in vitro* para o estudo da neuropatogenicidade do ZIKV. A infecção das culturas de células da glia promoveu um aumento da produção de Fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β), no decorrer da infecção, embora não tenha promovido gliose. Análises complementares de morte neuronal também foram realizadas para verificar o efeito do tratamento de culturas primárias de neurônios com um meio condicionado proveniente de culturas de glia infectadas com ZIKV. Estes resultados indicaram que neurônios tratados por 24h com meio condicionado proveniente de culturas gliais infectadas, não apresentaram alterações em índices de morte celular quando comparados aos controles sem infecção. Uma vez que as estratégias estabelecidas no presente trabalho fornecem um modelo *in vitro* interessante para avaliar consequências da infecção do ZIKV em diferentes células do SNC, novos experimentos serão realizados a fim de investigar o efeito dos fatores liberados por células da glia infectadas por ZIKV na viabilidade de neurônios, utilizando diferentes períodos de incubação e em diferentes fases de diferenciação.

PALAVRAS-CHAVE: ZIKV; glia; TNF- α ; IL-1 β ; morte neuronal.

ABSTRACT

Neuronal infection by Zika virus (ZIKV) has been the subject of extensive research in the past few years and many studies were focused on understanding its association with neurological syndromes such as microcephaly and Guillain Barré. Recent work from our research group (Olmo et al., 2017) has shown that ZIKV infection induced a form of non-autonomous neuronal cell death, *in vitro*, which can be regulated by increase of pro-inflammatory cytokines release and glutamate signaling. It is important to highlight that those results were generated in nearly pure neuronal cultures, in which very few or no astrocytes and microglia can be found. Due to the major role of glial cells in neurotransmitter metabolism and regulation of inflammatory processes in the brain, the present work was therefore aimed at the investigation of the effect of ZIKV infection in primary glial cell cultures as well as the contribution of infected glia cells in cytokine-promoted neuronal cell death. Different aspects of cellular responses were evaluated in primary cultures of glial cells infected with ZIKV for 24 and 48 hours, such as viral burden, microglia proliferation and gene-specific expression alterations. Our analyses were able to detect viral burden in 24- and 48-hours infected primary cultures demonstrating that ZIKV can successfully infect glial cells providing an *in vitro* model for ZIKV-induced neuro-toxicity studies. Increased expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β) was observed in ZIKV-infected glial culture although no microglia proliferation seemed to be associated with it. Complementary analyses of neuronal survival and viability were also performed to verify the effect of a treatment with conditioned medium from ZIKV-infected glial cultures on primary neuronal cultures. Our results indicated that neurons treated for 24 hours with virus-inactivated conditioned medium from infected glial cells did not present significant increase in cell death when compared to uninfected controls. Strategies established in the present work provide an interesting model for the *in vitro* analyses of ZIKV-induced processes in the CNS and further studies will be carried out in order to investigate whether cellular factors released by ZIKV-infected glial cells can promote neuronal death in different conditions.

KEYWORDS: ZIKV; glia; TNF- α ; IL-1 β ; neuronal death.

LISTA DE ABREVIACÕES

AXL Receptor tirosino-quinase do tipo AXL

BDNF Fator neurotrófico derivado do cérebro

cDNA DNA complementar

Ca²⁺ Íons cálcio

GBS Síndrome de Guillain-Barré – do inglês "Guillain-Barré Syndrome"

HBSS Tampão salino balanceado – do inglês "Hank's Balanced Salt Solution"

IL-1 α Interleucina-1 α

IL-1 β Interleucina-1 β

IL-6 Interleucina-6

IL-8 Interleucina-8

iNOS Enzima óxido nítrico sintase induzível

JEV Vírus da encefalite japonesa – do inglês "Japanese encephalitis virus"

MERTK Receptor tirosino-quinase do tipo MERTK

MCP-1 Proteína quimiotática de monócitos-1

MOCK Grupo controle não infectado com o ZIKV

mRNA RNA mensageiro

NMDAR Receptor de N-metil-D-Aspartato

NPCs Células neurais progenitoras humanas

PBS Tampão fosfato-salino

RNA Ácido ribonucleico – do inglês "ribonucleic acid"

RT-qPCR Reação de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo

SLC1a2 Transportador de glutamato

STAT-1 Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1

SNC Sistema nervoso central

TBEV Vírus da encefalite transmitida por carrapato – do inglês “Tick-borne encephalitis virus”

TNF- α Fator de necrose tumoral- α

Tyro3 Receptor tirosino-quinase do tipo Tyro3

ZIKV Vírus da Zika

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa representativo da ocorrência de febre Zika.

Figura 2. O Zika vírus (ZIKV) promove morte neuronal via GluN2B de forma não autônoma por meio da liberação de fatores neurotóxicos.

Figura 3. Tratamento com AraC não promoveu depleção de micróglia em culturas primárias de células da glia.

Figura 4. Expressão de mRNA de ZIKV em células da glia controle (MOCK) e infectadas (ZIKV).

Figura 5. Culturas primárias de células da glia infectadas com ZIKV não apresentam microgliose.

Figura 6. Infecção por ZIKV em culturas primárias de glia promove o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Figura 7. Infecção por ZIKV em culturas primárias de glia não altera a expressão de Glutaminase e Slc1a2.

Figura 8. Meio condicionado de culturas de glia infectadas por ZIKV não induz morte neuronal.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Breve histórico e aspectos epidemiológicos do Zika Vírus	9
1.2	Neurobiologia e Síndrome Congênita do Zika Vírus	11
1.3	Processos inflamatórios e morte celular relacionada ao ZIKV.....	14
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral.....	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Materiais	20
3.2	Animais experimentais	20
3.3	Vírus.....	20
3.4	Preparação de Cultura primária de Glia.....	21
3.5	Tratamento das culturas de glia com AraC.....	22
3.6	Infecção com ZIKV	22
3.7	Cultivo primário de células neuronais	23
3.8	Ensaio de morte celular.....	23
3.9	Imunofluorescência.....	24
3.10	Transcrição reversa e PCR quantitativa (qPCR).....	25
3.11	Análise de dados	26
4	RESULTADOS	27
4.1	Otimização do protocolo de culturas primárias de células da glia.....	27
4.2	Tratamento de culturas mistas de glia com AraC	27
4.3	Culturas primárias de células da glia apresentaram níveis significativos de mRNA viral 24 e 48 horas após infecção	28

4.4	A infecção com ZIKV parece não afetar proliferação celular de micróglia em culturas de glia	31
4.5	Células da glia infectadas com ZIKV expressam níveis significativos de citocinas pró-inflamatórias durante o processo da infecção	31
4.6	Infecção por ZIKV não altera a expressão de genes que regulam a concentração extracelular de glutamato	35
4.7	Meio condicionado de culturas primárias de células da glia infectadas com ZIKV não induz morte celular em culturas primárias de neurônios	35
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 1 INTRODUÇÃO

2 Nos últimos anos, a infecção por Zika vírus (ZIKV) tem sido um motivo de
3 alerta não apenas para a comunidade médica e científica, como também para a
4 população em geral, devido a abrangência de seu espalhamento intercontinental, a
5 extensa cobertura geográfica de seu vetor e sua associação a prejuízos no sistema
6 nervoso central (SNC) de neonatos. O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus*,
7 podendo ser transmitido a seres humanos de diversas formas, tais como: a picada de
8 mosquitos do gênero *Aedes* infectados (Boorman and Porterfield, 1956) ,
9 congenitamente (Brasil et al., 2016) e sexualmente (Foy et al., 2011). Dessa forma,
10 devido à complexidade das questões relacionadas à infecção por esse patógeno,
11 torna-se relevante o aprofundamento do conhecimento da biologia desse vírus.

12

13 1.1 Breve histórico e aspectos epidemiológicos do Zika Vírus

14 O ZIKV foi primeiramente isolado de um primata não humano, em abril de
15 1947, por pesquisadores que estudavam a febre amarela silvestre na Uganda. Esse
16 achado se deu após um macaco, o Rhesus 766, apresentar estado febril incomum, o
17 que levou à coleta do seu sangue para análise. Após as análises iniciais, o soro desse
18 animal foi inoculado intracerebralmente e intraperitonealmente em camundongos e
19 subcutaneamente em outro macaco. Durante um período de cerca de um mês esses
20 animais foram observados, mas apenas os que haviam sido inoculados
21 intracerebralmente apresentaram sinais de doença. Desse modo, sucederam-se mais
22 testes sorológicos e subseqüentes isolamentos com posterior identificação de uma
23 cepa que não se relacionava com os vírus até então descritos. A partir desses
24 resultados, trabalhos começaram a ser desenvolvidos para a caracterização do ZIKV
25 (Dick et al., 1952).

26 Sessenta anos após essa identificação ocorreu o primeiro surto de infecção
27 pelo ZIKV, em 2007, na Micronésia. Durante esse surto, os sintomas clínicos
28 observados foram erupção cutânea, conjuntivite e artralgia (Duffy et al., 2009). Essa
29 doença atingiu cerca de 90% dos municípios das ilhas Yap e por volta de 73% da
30 população. Testes com anticorpos neutralizantes e análises por reação em cadeia da
31 polimerase em tempo real (RT-PCR), confirmaram a presença de RNA do ZIKV no

1 soro desses pacientes (Duffy et al., 2009). Assim, confirmou-se a transmissão do
2 vírus fora da África e Ásia, onde já haviam sido relatados casos esporádicos
3 anteriormente (Fagbami, 1979; Olson et al., 1981), e instalou-se assim um possível
4 alerta para seu espalhamento para outros continentes (Duffy et al., 2009; Hayes,
5 2009). Entre os meses de outubro de 2013 e abril de 2014, um surto expressivo de
6 infecção por ZIKV foi reportado na região da Polinésia Francesa. Durante esse
7 episódio, observou-se um aumento no número de casos da síndrome de Guillain-
8 Barré (GBS), o que foi posteriormente associado a infecção por ZIKV, uma vez que
9 foram detectados anticorpos neutralizantes para esse vírus nesses pacientes (Cao-
10 Lormeau et al., 2016). Além disso, durante esse surto os pacientes apresentaram
11 características eletrofisiológicas compatíveis com um tipo de neuropatia axonal
12 motora aguda que se caracteriza por sinais de imobilidade dos músculos da face,
13 alteração da marcha e fraqueza muscular generalizada (Cao-Lormeau et al., 2016)

14 Nos anos subsequentes, foram relatados alguns casos esporádicos da doença,
15 até seu aparecimento na América do Sul no ano de 2015. Nesse ano, pacientes de
16 um hospital em Camaçari no estado da Bahia procuraram atendimento para os
17 seguintes sintomas: erupção maculopapular, febre, mialgias, artralgia e conjuntivite,
18 sendo que alguns deles foram diagnosticados com a presença do material genético
19 do ZIKV no soro sanguíneo. Nesse hospital também foram diagnosticados casos de
20 infecção por Chikungunya vírus, contudo não houve infecção simultânea pelos dois
21 vírus em um mesmo paciente. Assim, com as investigações desses casos houve um
22 alerta inicial de que o ZIKV havia chegado ao Brasil (Naccache et al., 2016).

23 Embora estudos de isolamento de vírus realizados entre os anos de 1971 e
24 1975 na Nigéria por Fagbami (1979), bem como a epidemia na Micronésia (Duffy et
25 al., 2009) , tenham associado o ZIKV a doença febril leve em humanos, sendo na
26 maioria dos casos assintomática, no Brasil, durante a epidemia de ZIKV, foram
27 notificados casos de síndromes neurológicas, incluindo casos de microcefalia, em
28 fetos de mães infectadas (Brasil et al., 2016) . A associação entre a infecção pelo
29 ZIKV e o desenvolvimento de microcefalia em neonatos foi primeiramente
30 evidenciado em um estudo de caso realizado por Mlakar e colaboradores (2016), o
31 qual apresentou como principais resultados calcificações difusas e atrofia nas
32 regiões da substância branca e cinzenta do córtex cerebral de um feto acometido por
33 infecção transplacentária pelo ZIKV. Estudos posteriores vieram a ratificar essa

1 possível associação da infecção viral com achados clínicos relacionados a danos
 2 neurais em fetos (Calvet et al., 2016). Em virtude desses achados e da extensa
 3 abrangência geográfica da epidemia, como apresentado na Figura 1, o ZIKV tornou-
 4 se um assunto de atenção global. Por conseguinte, esforços para a compreensão dos
 5 mecanismos pelos quais o vírus invade as células e causa sua patogenicidade estão
 6 sendo investigados com o intuito de se tentar minimizar os efeitos consequentes
 7 dessa doença.

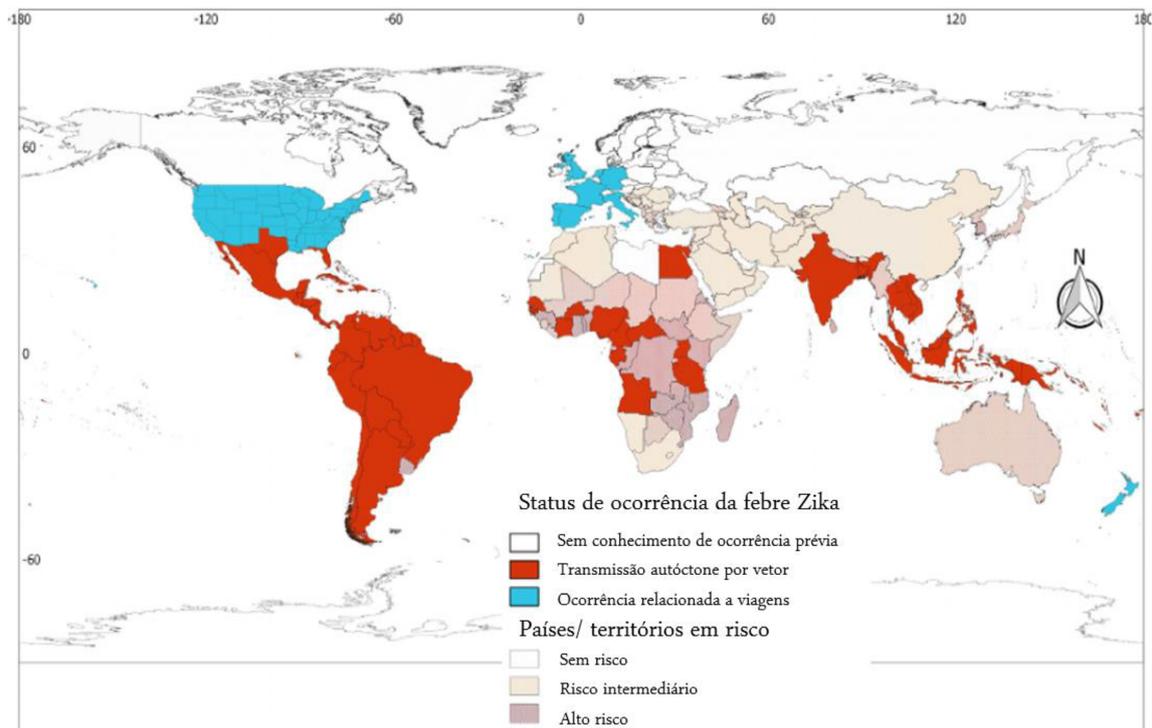


Figura 1. Mapa representativo da ocorrência de febre Zika. O mapa mostra que a maioria dos locais

9 1.2 Neurobiologia e Síndrome Congênita do Zika Vírus

10 O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*, constituindo-
 11 se em um vírus de RNA de fita simples senso positivo capaz de traduzir suas
 12 proteínas diretamente com o auxílio da maquinaria das células infectadas. A fim de
 13 obter êxito na endocitose, os flavivírus, assim como o ZIKV, podem iniciar seu
 14 processo infeccioso por interação com receptores presentes na membrana das células
 15 hospedeiras por meio de seu envelope glicoproteico. Dessa forma, os flavivírus

1 podem interagir com os receptores tirosina quinase da família TAM (TYRO3, AXL
2 e MER), receptores de lectina do tipo C, receptores de fosfadilserina,
3 imunoglobulinas de células T e domínio de mucina (TIM) (Perera-Lecoin et al., 2013).

4 Achados recentes mostraram que dentre todos os receptores citados
5 anteriormente, o AXL seria um forte candidato a permitir a entrada do vírus nas
6 células da glia (Meertens et al., 2017). Nesse trabalho foi demonstrado que micróglias
7 e astrócitos humanos no cérebro em desenvolvimento, seriam capazes de expressar o
8 AXL, e esse receptor, além de intermediar a entrada do vírus nas células, poderia ser
9 capaz de modular a sinalização do interferon, atuando assim sobre a resposta imune
10 inata (Meertens et al., 2017).

11 Embora esses achados sugiram que esse receptor esteja envolvido na entrada
12 do vírus nas células da glia, o trabalho de Miner e colaboradores (2016) apresentou
13 resultados de níveis de infecção equivalentes entre modelos knockout duplo para
14 AXL e MERTK. Além disso, esse trabalho também demonstrou a presença de altos
15 níveis de RNA viral em lágrimas, propondo que o vírus poderia ser secretado por
16 outras formas não convencionais (Miner et al., 2016).

17 Hastings e colaboradores (2017) também avaliaram as condições para a
18 entrada do ZIKV nas células intermediada por receptores TAM, utilizando
19 camundongos tipo selvagem e knockout para esses receptores. Para isso, o vírus foi
20 inoculado por diversas rotas, tais como intravaginalmente, intracerebralmente e
21 subcutaneamente. Os resultados desse trabalho não mostraram interdependência da
22 presença de TAM para o estabelecimento de infecção em camundongos (Hastings et
23 al., 2017). Ou seja, ainda há debates sobre como o ZIKV penetra nas células sendo
24 que, esclarecimentos relacionados a entrada do vírus são cruciais para o
25 estabelecimento de estratégias de prevenção e minimização da infecção.

26 Após o aumento exponencial do número de recém-nascidos apresentando
27 microcefalia durante o surto de ZIKV no Brasil, diversos estudos reforçaram a
28 correlação entre a infecção viral e os danos neurológicos (Schuler-Faccini et al., 2016).
29 Nesse sentido, um estudo de caso realizado em 2016 investigou a possibilidade do
30 ZIKV ser um potencial agente infeccioso para o SNC de fetos em desenvolvimento
31 por ser capaz de atravessar a barreira placentária (Calvet et al., 2016). Os achados

1 desse trabalho demonstraram a presença de RNA viral nos líquidos amnióticos
2 colhidos das gestantes (Calvet et al., 2016). Além disso, análises morfológicas
3 confirmaram a microcefalia em ambos dois casos analisados (Calvet et al., 2016).
4 Adicionalmente, um estudo realizado no Brasil contando com 88 gestantes que
5 haviam apresentado erupções cutâneas durante a gravidez revelou que 82% das
6 pacientes eram positivas para o ZIKV por análises de RT-PCR. Das mulheres
7 positivas para a presença do vírus e que fizeram ultrassonografia fetal, 29% dos
8 exames demonstraram anormalidades no desenvolvimento morfofisiológicos dos
9 fetos (Brasil et al., 2016) . Ademais, entre as alterações observadas, pôde-se observar
10 restrição do crescimento intrauterino, com ou sem microcefalia, órbitas fetais,
11 calcificações e lesões no SNC (Brasil et al., 2016) .

12 Considerando-se assim as consequências expressivamente negativas
13 advindas da infecção intrauterina pelo ZIKV, modelos *in vivo* e *in vitro* foram
14 desenvolvidos para se investigar como esse microrganismo poderia desencadear tais
15 distúrbios, como a microcefalia. Em trabalho realizado por Tang e colaboradores
16 (2016), células progenitoras neuronais humanas foram eficientemente infectadas
17 pelo vírus da Zika e, por conseguinte, exibiram níveis desregulados de genes de
18 componentes do ciclo celular, desencadeando assim morte celular e crescimento
19 mitigado (Tang et al., 2016).

20 Devido à complexidade do fenômeno da microcefalia e o seu efeito sobre os
21 embriões em desenvolvimento, Li e colaboradores (2016) utilizaram um modelo
22 murino *in vivo* e a cepa asiática do ZIKV para a melhor compreensão desse
23 fenômeno. Seus resultados demonstraram a ocorrência de apoptose, inibição da
24 diferenciação e desregulação do ciclo celular em células progenitoras neurais, além
25 de microcefalia e afinamento das camadas corticais dos tecidos neurais (Li et al.,
26 2016). Além disso, análises de expressão gênica demonstraram regulação positiva de
27 possíveis candidatos a receptores de entrada de flavivírus.

28 Um estudo posterior avaliou os distúrbios congênitos causados pelo vírus,
29 demonstrando que a cepa brasileira do ZIKV também era danosa ao promover uma
30 diminuição do volume cerebral do modelo murino *in vivo*, o que poderia ser um
31 indício de microcefalia (Cugola et al., 2016). Nessa investigação, também foi
32 constatada a indução de morte de células progenitoras corticais humanas *in vitro*.

1 Além disso, utilizando-se organoides cerebrais humanos, também foi demonstrado
2 os efeitos deletérios da infecção pelo ZIKV, o que gerou consequentes reduções das
3 camadas corticais intermitentes e da zona proliferativa (Cugola et al., 2016).

4 Entretanto, embora vários trabalhos tenham contribuído para o entendimento
5 do vínculo entre contágio viral pelo ZIKV e disfunções congênitas neurais, tais
6 como a microcefalia, muitos processos ainda não foram completamente elucidados.
7 Dessa forma, mais pesquisas devem ser direcionadas para o esclarecimento da
8 patogenicidade desse vírus.

10 **1.3 Processos inflamatórios e morte celular relacionada ao ZIKV**

11 Para o estabelecimento de uma resposta imune funcional a qualquer tipo de
12 injúria, o SNC tende a iniciar, em geral de forma controlada, uma reação para a
13 preservação de sua homeostasia recrutando células imunológicas periféricas e
14 propiciando a ativação de células efectoras residentes nesse tecido através da criação
15 de um microambiente para sua atuação (Shrikant and Benveniste, 1996). Assim
16 sendo, a defesa do tecido neural contra danos do tipo infecções, processos
17 inflamatórios, trauma, isquemia, tumores e neurodegeneração pode ser realizada por
18 micróglia ativas, sendo que sua citotoxicidade ocorre, na maioria das vezes em
19 resposta a danos neuronais (Kreutzberg, 1996). Dessa forma, o processo
20 inflamatório direto, como é o caso do reconhecimento de estímulos como, por
21 exemplo, a presença de um vírus, leva à reação imediata das micróglia, fazendo
22 com que elas saiam do seu estado vigilante e se tornem ativas e passem a secretar
23 citocinas pró-inflamatórias. (Liu et al., 2011). Uma vez que já é sabido que as
24 citocinas são proteínas que auxiliam na interação intercelular e intertecdual,
25 diversos trabalhos buscam entender como essa sinalização ocorre para a manutenção
26 equilibrada das funções do indivíduo e combate a qualquer ameaça.

27 Durante a fase inicial do processo de ativação, as micróglia são capazes de
28 alterar sua morfologia passando de um estado geralmente caracterizado por corpo
29 celular pequeno e ramificações estreitas para um estado de corpo celular robusto,
30 apresentando alteração de seus prolongamentos, os quais se tornam ameboides.
31 Segue-se então, sua migração para a área atingida com conseguinte deliberação de

1 processos fagocíticos, além de liberação de fatores pró-inflamatórios e consequente
2 proliferação celular (Kreutzberg, 1996).

3 Durante a ativação da micróglia, essa é capaz de ativar as células astrocíticas
4 (Liu et al., 2011). Uma vez ativadas, os astrócitos atuam na ativação de mais células
5 microgliais devido à liberação de fatores inflamatórios, estabelecendo assim uma
6 resposta imune inicial (Liu et al., 2011). Foi proposto que existem pelo menos dois
7 tipos de astrócitos. Os astrócitos A1 são induzidos pela liberação, por parte das
8 micróglia, de interleucina 1 alfa (IL-1 α), fator de necrose tumoral (TNF) e
9 componente C1q do complemento. Após essa indução eles se tornam incapazes de
10 manter a sobrevivência neuronal, assim como outras funções vitais relacionadas ao
11 crescimento neuronal e a sinaptogênese (Liddel et al., 2017). Os astrócitos do
12 tipo A2 podem atuar na sobrevivência, no reparo e no desenvolvimento de
13 neurônios. Para isso, são capazes de regular positivamente fatores neurotróficos,
14 como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), por exemplo (Li et al.,
15 2019). Liddel e colaboradores (2017) também demonstraram em seu trabalho que
16 esse tipo de astrócito A1 está presente de forma considerável em doenças
17 neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer, Huntington, Parkinson,
18 esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla (Liddel et al., 2017). Assim,
19 uma ativação exacerbada tanto de astrócitos quanto de micróglia no cérebro pode
20 se tornar deletéria, levando à neurodegeneração devido ao processo de
21 neuroinflamação.

22 As células da glia podem ser moduladas não só por fatores inflamatórios,
23 como citocinas, como também por neurotransmissores (Pocock and Kettenmann,
24 2007). Exemplos de interações entre neurotransmissores e células da glia foram
25 demonstrados em estudos cujos resultados indicaram uma ação sinérgica entre o
26 glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC, e o TNF- α em fatias de
27 tecido cerebral (Zou and Crews, 2005). Interessantemente, a principal consequência
28 dessa associação foi o aumento considerável da morte neuronal (Zou and Crews,
29 2005). Outro trabalho, dessa vez relacionado às doenças infecciosas, analisou uma
30 flavivirose que acomete o SNC, a encefalite japonesa, a qual promove diversos
31 danos neuronais (Chen et al., 2012). Nessa investigação, Chen e colaboradores
32 (2012) demonstraram que a infecção de micróglia pelo vírus da encefalite japonesa
33 (JEV) promovia um aumento considerável dos níveis de TNF- α e que a adição desse

1 meio condicionado à cultura neuronal aumentava a síntese do glutamato e diminuía
2 a sua recaptação, o que culminaria num aumento da excitotoxicidade e consequente
3 morte neuronal (Chen et al., 2012).

4 Embora a morte neuronal ocorra não apenas em situações de combate a
5 agentes patológicos ou injúrias, pois ela também pôde ser observada durante fases
6 do desenvolvimento (Fricker et al., 2018), as ocorrências de processos inflamatórios
7 no SNC podem ter consequências devastadoras e diferentes das que ocorrem em
8 tecidos periféricos. Esse fato se deve provavelmente à singularidade do SNC e sua
9 possível imunossupressão intensa (Gebicke-Haerter, 2001). Por esse motivo, torna-
10 se intensos os esforços em se compreender como essa resposta se desenvolve a fim
11 de se estabelecerem abordagens terapêuticas eficientes.

12 Em estudo recente sobre a relação das implicações decorrentes da
13 infectividade pelo ZIKV nas células do SNC, foi apontado como fator crucial para a
14 intensificação desse fenômeno a liberação por macrófagos humanos de citocinas,
15 como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a interleucina 1 β (IL-1 β) e a
16 interleucina 6 (IL-6). Essas citocinas poderiam induzir a expressão de uma proteína
17 com efeito anti-viral, a colesterol 25 Hidroxilase (CH25H), por meio do estímulo do
18 transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1) e independente da produção
19 de interferon (Magoro et al., 2019). Ou seja, é relevante entender que a infecção e
20 todo o processo inflamatório poderiam desencadear não apenas respostas deletérias,
21 como também a ativação de uma resposta anti-viral.

22 Além do mais, a observação dos alvos celulares aos quais o ZIKV está
23 associado até então permanecem em andamento. Por exemplo, células neurais fetais
24 foram submetidas à infecção pelo ZIKV e o efeito desencadeado na cultura foi o
25 aumento da vulnerabilidade dos astrócitos frente à infecção (Huang et al., 2018) .
26 Interessantemente, o estudo expôs ainda que essas células poderiam apresentar um
27 progressivo efeito citopático e apoptótico (Huang et al., 2018). Adicionalmente a
28 esses achados, análises de casos de tecidos cerebrais de 9 fetos acometidos por
29 ZIKV através de transmissão congênita constatou que as micróglias são as células
30 mais passíveis à infecção pelo vírus, além de exibirem aumento da expressão das
31 citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), a
32 qual auxilia na resposta imune (Lum et al., 2017).

1 A fim de se entender mais amplamente a morte neuronal causada pela
2 infecção do ZIKV, estudo feito por Costa e colaboradores (2017) demonstrou que o
3 bloqueio de um dos receptores de glutamato, o N-metil-D-aspartato (NMDAR),
4 promoveu um efeito neuroprotetor capaz de resguardar as células da morte neuronal
5 induzida pela infecção pelo ZIKV. Complementarmente, nosso grupo avaliou os
6 mecanismos de morte neuronal induzido pelo ZIKV, bem como os mecanismos
7 relacionado à neuroproteção via bloqueio do NMDAR. Os resultados obtidos
8 demonstram que, nos estágios iniciais de infecção, a morte celular em culturas
9 neuronais infectadas com ZIKV ocorre de forma não autônoma, ou seja, os
10 neurônios positivos para o ZIKV liberam fatores tóxicos que promovem a morte dos
11 neurônios adjacentes (Olmo et al., 2017). Os fatores tóxicos liberados pelos
12 neurônios infectados identificados nesse estudo foram citocinas pró inflamatórias,
13 incluindo o TNF- α e a IL-1 β , e o glutamato (Figura 2) (Olmo et al., 2017). O
14 aumento da produção e liberação dessas moléculas possibilitou um efeito
15 excitotóxico por meio da ativação dos NMDARs, promovendo a morte neuronal
16 (Olmo et al., 2017). Ademais, o bloqueio desses receptores resultou no aumento da
17 ativação de vias biológicas envolvidas na sobrevivência celular e diminuição da
18 morte neuronal (Olmo et al., 2017). E embora nosso trabalho anterior tenha focado
19 em culturas neuronais, dados da literatura demonstram a importância da inter-
20 relação entre células da glia e neurônios para a manutenção da homeostase cerebral.
21 Assim, no presente estudo buscou-se, primordialmente, compreender qual seria a
22 contribuição das células da glia para a infecção pelo ZIKV e consequente morte
23 neuronal.

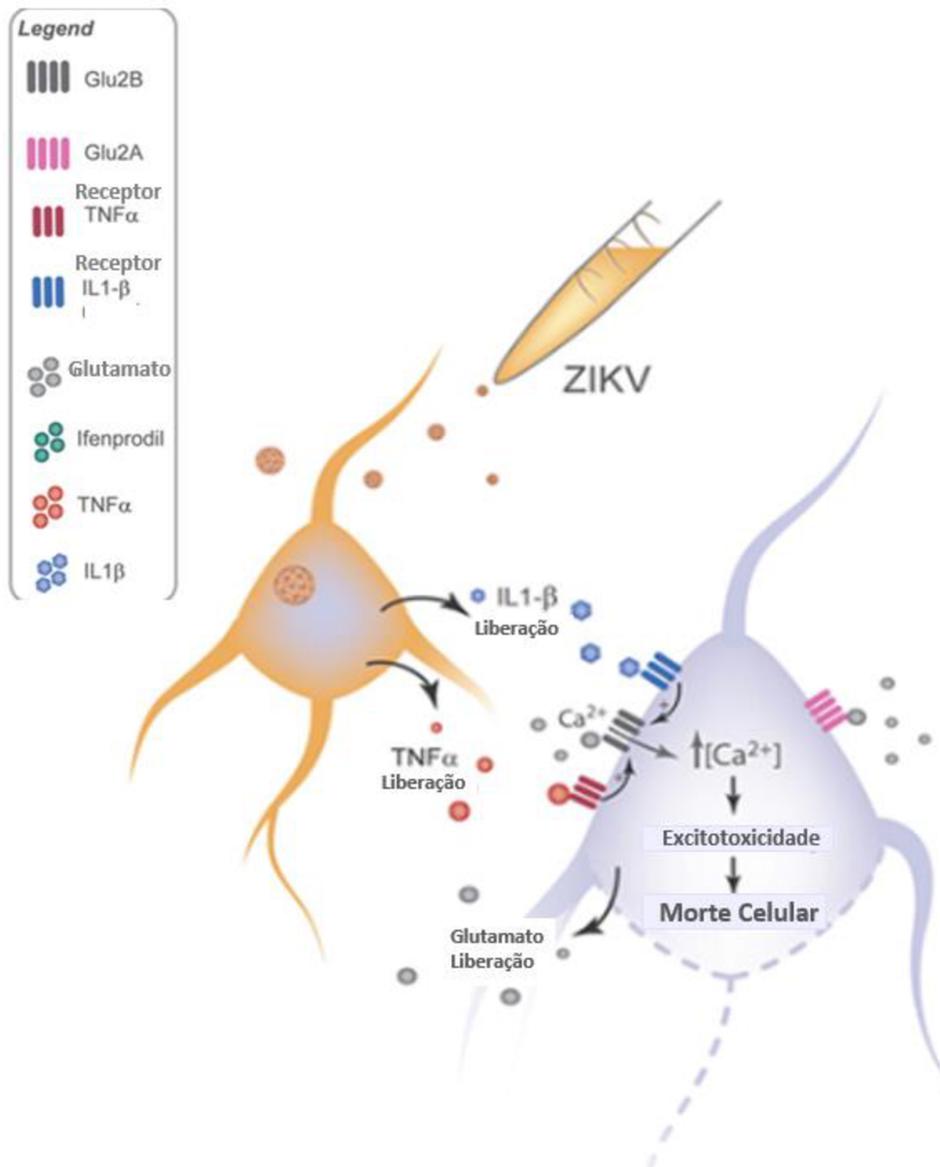


Figura 2. O Zika vírus (ZIKV) promove morte neuronal via GluN2B de forma não autônoma por meio da liberação de fatores neurotóxicos. Culturas neuronais infectadas com ZIKV liberam glutamato e citocinas, desencadeando a sensibilização e ativação do receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) contendo GluN2B e aumentando, conseqüentemente, o influxo de Ca^{2+} intracelular e facilitando a excitotoxicidade. Adaptado de Olmo et al., 2017.

1 2 OBJETIVOS

2 2.1 Objetivo Geral

3 O objetivo deste trabalho foi analisar a existência de alterações em fatores
4 celulares e moleculares decorrentes da infecção por ZIKV em células da neuroglia, além
5 de analisar a relação desses fatores com a morte neuronal.

6

7 2.2 Objetivos Específicos

8 2.2.1. Padronizar um modelo experimental *in vitro* de infecção por ZIKV em
9 células da glia;

10 2.2.2. Estabelecer uma cultura de células predominantemente astrocitária;

11 2.2.3. Analisar se há alteração na proliferação de ZIKV em culturas primárias
12 de células da glia;

13 2.2.4. Avaliar se infecção por ZIKV induz variações na proliferação de
14 micróglias em culturas de glia;

15 2.2.5. Investigar se ocorrem modificações nos níveis de expressão de citocinas
16 pró-inflamatórias em células da glia infectadas por ZIKV;

17 2.2.6. Examinar se ocorrem alterações nos níveis de expressão de proteínas que
18 regulam a concentração de glutamato extracelular em células da glia
19 infectadas por ZIKV;

20 2.2.7. Avaliar se fatores liberados por células da glia infectadas por ZIKV
21 podem ativar processos que resultam em morte neuronal *in vitro*.

1 3 MATERIAIS E MÉTODOS

2 3.1 Materiais

3 *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose*, Penicilina e
4 Streptomicina, Soro Fetal Bovino, suplementos N-2 e B-27® e GlutaMAX, todos
5 esses reagentes foram adquiridos da Gibco™. *LIVE/DEAD Cell Viability Assays*
6 poli-L-Lisina e AraC foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. TRIzol™ Reagent, anti-
7 *mouse* Alexa Fluor 546 foram adquiridos da Invitrogen, anticorpos anti-*rabbit* Alexa
8 Fluor 488, DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) e
9 paraformaldeído 04% foram adquiridos da Life Technologies™. Meio
10 Neurobasal™, kit Power SYBR® Green PCR Master Mix, dNTPs foram adquiridos
11 da Thermo Fisher Scientific, anti-Iba1 (Wako), Hidromount (National Diagnostics).
12 H2O Nucleasefree foi adquirida da Ambion®.

13

14 3.2 Animais experimentais

15 Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 tipo selvagem com
16 idade mínima de 08 semanas. Esses animais foram adquiridos do Centro de
17 Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de
18 Minas Gerais (ICB-UFMG) e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica
19 e Imunologia do ICB-UFMG, em microisoladores, sob ciclo de 12 horas de
20 luminosidade e 12 horas de escuro com temperatura constante entre 22-23°C. Sua
21 alimentação e água foram fornecidas *ad libitum*. Esse estudo está de acordo com as
22 recomendações do Governo Brasileiro (Lei 11794/2008a) e foi aprovado pela
23 Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG) de acordo com o
24 número protocolo 242/2016.

25

26 3.3 Vírus

27 As alíquotas de ZIKV foram adquiridas de um isolado proveniente de um
28 paciente sintomático no estado da Bahia, Brasil em 2015, (HS-2015-BA-01). Os
29 estoques virais foram disseminados em células C6/36 de *Aedes albopictus* e
30 titulados segundo descrito anteriormente em (Costa et al., 2017). O genoma completo

1 do vírus está disponível no banco de dados GenBank com o n° de acesso
2 KX520666.

3

4 **3.4 Preparação de Cultura primária de Glia**

5 Para a obtenção das culturas primárias de glia utilizadas nesse estudo, fêmeas
6 grávidas de camundongos da linhagem C57BL/6 foram sacrificadas por
7 deslocamento cervical e posteriormente, o abdômen dos animais foi limpo
8 cuidadosamente com etanol 70%. Tesouras e pinças estéreis foram utilizadas para
9 abertura da região abdominal e retiradas dos embriões (E15/16). Esses foram postos
10 imediatamente em placas de 35 mm (Sarstedt) contendo solução de *Hank's*
11 *Balanced Salt Solution* (HBSS) gelado, cuja composição segue-se: 0,137 M NaCl;
12 5,4 mM KCl; 0,25 mM Na₂HPO₄; 0,1 mM glucose; 0,44 mM KH₂PO₄; 1,3 mM
13 CaCl₂; 1,0 mM MgSO₄; 4,2 mM NaHCO₃. A dissecação dos cérebros ocorreu em
14 capela de fluxo laminar em condições estéreis com o auxílio de microscópio de
15 dissecação. Resumidamente, os embriões foram retirados das placentas, dispostos em
16 novas placas de 35 mm (Sarstedt) com HBSS gelado e os crânios foram abertos com
17 o uso de pinças tendo então, os cérebros removidos. Após a remoção cerebral, esses
18 foram divididos nos dois hemisférios, e houve a retirada das meninges e separação
19 dos córtices das demais áreas. Foram obtidos então, córtices cerebrais de ambos
20 hemisférios que foram mantidos à 4°C em tubos cônicos de 15 mL (Sarstedt) por
21 uma hora, e em seguida os tecidos foram centrifugados à 400 rpm por 08-10
22 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e os pellets foram ressuspensos
23 em 05 mL de DMEM High Glucose (Gibco™). A seguir, os tecidos foram
24 fragmentados com o uso de pipetas sorológicas de 10 mL (Sarstedt) e por seguinte
25 foram plaqueados em frascos para cultura celular T-25 (Sarstedt) anteriormente
26 revestidos de poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich®). Os frascos foram mantidos em
27 incubadora umidificada à 37°C com 05% de CO₂. O meio de cultura foi trocado de
28 quatro em quatro dias e sempre foi observada a confluência, a diferenciação celular
29 e se havia presença de microorganismos contaminantes, como fungos, por exemplo.

30

1 **3.5 Tratamento das culturas de glia com AraC**

2 Com o objetivo obter culturas predominantemente astrocitárias a partir de
3 culturas primárias de células da glia, optou-se por realizar um tratamento prévio
4 com Cistosina-beta-D-arabinofuranosídeo (AraC 20mg/mL - Sigma-Aldrich®) um
5 conhecido agente anti-mitótico capaz de interagir e inibir a replicação de DNA
6 (Hamby et al., 2006). Dessa forma, entre 07-09 dias após o estabelecimento das
7 culturas primárias mistas, essas atingiam a confluência de aproximadamente 100%,
8 e eram transferidas para placas de cultura de 100 mm. Após 12-14 dias essas células
9 eram repassadas para análises por imunofluorescência. Para isso, as células eram
10 repassadas para lamínulas de vidro com aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células por
11 lamínula. Aguardava-se a confluência atingir em torno de 100% e realizava-se o
12 tratamento com AraC (Sigma-Aldrich®) por 7 dias. O AraC (20mg/mL - Sigma-
13 Aldrich®), foi diluído 1:10000 v/v em DMEM High Glucose (Gibco™). Terminado
14 o tratamento, era adicionado DMEM High Glucose (Gibco™) e procedia-se o
15 protocolo de imunofluorescência.

16

17 **3.6 Infecção com ZIKV**

18 Para a realização das infecções virais das culturas primárias de glia,
19 inicialmente o meio condicionado das células foi retirado e armazenado em freezers
20 -80°C em tubos cônicos de 50 ml (Sarstedt). Logo após, as células foram incubadas
21 com ZIKV (MOI=1,0) para análises por imunofluorescência e (MOI=0,1) para
22 análises por RT-PCR, ou com sobrenadante de C6/36 (MOCK) diluídos em DMEM
23 High Glucose (Gibco™) pelo período de uma hora. Decorrido esse tempo, o vírus
24 residual era removido, o poço era lavado com o próprio meio condicionado
25 anteriormente coletado e então era adicionado DMEM High Glucose (Gibco™). Os
26 experimentos para análise de liberação de citocinas, expressão de transportadores,
27 aumento de mRNA e infecção viral foram realizados 24 e 48 horas após a infecção.
28 Foi recolhido no tempo de 48h pós infecção os meios condicionados de MOCK e
29 ZIKV, e armazenados em freezer -80°C para a realização de ensaio de morte
30 neuronal. Para os experimentos por imunofluorescência, as placas contendo
31 lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 04% (Life technologies™) 24 e 48
32 horas após a infecção.

1

2 **3.7 Cultivo primário de células neuronais**

3 Culturas primárias de neurônios foram preparadas a partir de córtices
4 cerebrais de embriões (E15/16) de camundongos C57BL/6 tipo selvagem. Os
5 cérebros foram dissecados em solução gelada de HBSS e os córtices foram sujeitos
6 à digestão por tripsina. Posteriormente, seguiu-se à dissociação celular com o
7 auxílio de pipeta Pasteur de vidro com pontas levemente arredondadas. Utilizou-se
8 Câmara de Neubauer para a execução da contagem de células e servindo-se de
9 placas de 04 poços cobertas previamente por poli-L-ornitina (Sigma-Aldrich®) as
10 células foram então plaqueadas com Neurobasal™ (Thermo Fisher Scientific)
11 suplementado com N-2 e B-27® (Gibco™), 2 mM de GlutaMAX™ (Gibco™),
12 penicilina e streptomomicina (50 mg/mL cada -Gibco™). Mantiveram-se as culturas
13 em incubadora umidificada por 07 dias a 37°C com 05% de CO₂. O meio de cultura
14 foi trocado no quarto dia e sempre foi observada a confluência, a diferenciação
15 celular e se havia presença de microorganismos contaminantes.

16

17 **3.8 Ensaio de morte celular**

18 Culturas neuronais foram preparadas em placas de 04 poços e diferenciadas
19 por 07 dias antes de serem tratadas com as soluções na proporção de 1:1 v/v
20 descritas a seguir: Meio Neurobasal™ (Thermo Fisher Scientific), DMEM High
21 Glucose (Gibco™), meio condicionado de células da glia infectadas com MOCK
22 por 48h, meio condicionado de células da glia infectadas com ZIKV por 48h
23 inativado por UV e não inativado, e solução contendo suspensão de ZIKV diluído
24 em Meio Neurobasal™ (Thermo Fisher Scientific), (MOI=1,0). Sumariamente, o
25 meio condicionado colhido após 48h de infecções com MOCK e ZIKV realizadas
26 em células da glia foi condicionado em freezer -80°C. Em seguida, esses meios
27 foram inativados sob luz U.V. por um período de 1 hora e utilizados para o
28 tratamento dos neurônios. O meio Neurobasal™ (Thermo Fisher Scientific),
29 presente nas placas de cultura neuronais foi retirado e mantido em tubos cônicos de
30 15 mL (Sarstedt). Em seguida, adicionou-se 250 µL desse meio condicionado em
31 cada poço, garantindo assim um volume final igual para todos os poços.

1 Posteriormente, adicionou-se em cada poço 250 μ L de tratamento proveniente das
2 soluções descritas anteriormente e as placas foram mantidas por 24h em incubadora
3 à 37°C com 05% de CO₂. Para o ensaio de morte celular, foi utilizado o kit
4 *LIVE/DEAD Cell Viability Assays* (Sigma-Aldrich®) como descrito anteriormente
5 por (Doria et al., 2013). Decorrido o tempo de 24h, as células foram lavadas duas
6 vezes com Tampão Fosfato Salina (PBS 1x) e incubadas durante 15 minutos com as
7 soluções de 02 μ M de calceína-AM que distingue células vivas através de sua
8 ligação com cálcio intracelular e 02 μ M de homodímero de etídeo reagente que se
9 liga ao DNA de células mortas. Fotomicrografias dos sinais de fluorescência foram
10 adquiridas utilizando-se de microscópio de fluorescência *Fluorimager Cell Imaging*
11 *Station* (Thermo Fisher Scientific). Três imagens foram adquiridas para cada poço,
12 totalizando um número mínimo de 06 imagens para cada condição experimental. A
13 análise das imagens consistiu em determinar o número de células vivas (positivas
14 para calceína-AM) e mortas (positivas para homodímero de etídeo 1), a contagem
15 foi feita por um observador cego empregando o software ImageJ. A porcentagem de
16 células mortas foi expressa sobre o número total de células.

18 3.9 Imunofluorescência

19 Análises de imunofluorescência foram realizadas para permitir a visualização
20 das células da glia infectadas com ZIKV e verificar possíveis alterações nas
21 populações de astrócitos e micróglia causadas por esta infecção. Culturas de glia
22 foram infectadas como descrito em (Olmo et al., 2017) e fixadas nos tempos de 24 e
23 48 horas após a infecção. Sendo assim, as culturas de glia são lavadas duas vezes
24 com PBS 1x e fixadas por 20 minutos com paraformaldeído 04% (Life
25 technologies™). Logo após, as placas são lavadas três vezes com PBS-T (PBS
26 contendo Triton 0,3%) para promover a permeabilização das amostras. Em seguida,
27 as amostras são incubadas em câmara umedecida à temperatura de 04°C *overnight*
28 com os anticorpos primários diluídos em solução de PBS-T. Os seguintes anticorpos
29 foram utilizados no presente estudo: mouse anti-4G2 (diluído 1:300) que reconhece
30 as proteínas do envelope viral, *rabbit* anti-Iba1 (utilizado como marcador de
31 micróglia, diluído 1:500), *rabbit* anti-S100 β (utilizado como marcador de astrócitos,
32 diluído 1:500). A etapa seguinte consistiu em 3 lavagens com a solução de PBS-T

1 por 5 minutos cada lavagem, e as células são então incubadas por uma hora à
2 temperatura ambiente, em câmara escura umedecida com os anticorpos secundários
3 diluídos em PBS-T: A combinação de anti-*rabbit* conjugado com Alexafluor-546 e
4 anti-*mouse* conjugado com Alexafluor-488 (ambos na diluição de 1:500), foi
5 utilizada para visualizar micróglia ou astrócitos e ZIKV, respectivamente. Nesta
6 etapa utilizou-se também DAPI ou Hoechst (na diluição de 1:500) para marcação
7 dos núcleos das células. Finalmente, as amostras foram lavadas três vezes, por cinco
8 minutos cada lavagem com a solução de PBS-T, e seguiu-se a montagem das
9 lâminas utilizando-se de Hidromount (National Diagnostics). O Microscópio Axio
10 Imager Apotome.2 (Zeiss) foi utilizado para aquisição de imagens, sendo ele
11 equipado com objetivas de 10, 20, 40 e 60X e módulo Apotome 2 para aquisição de
12 imagens confocais e software Zen.

14 **3.10 Transcrição reversa e PCR quantitativa (qPCR)**

15 Para análise da expressão gênica as amostras passaram por um processo de
16 extração, clarificação, precipitação, e isolamento de RNA total pelo método de
17 TRIzol™ segundo as normas do fabricante (Invitrogen™). As amostras foram
18 recolhidas nos tempos de 24 e 48h após a infecção com MOCK ou ZIKV e mantidas
19 em freezer -80°C até sua utilização. Após o isolamento e estocagem, o RNA foi
20 ressuscitado em 11 µL de água livre de nucleases DEPC, e sua concentração
21 medida por espectrofotômetro (NanoDrop™, Thermo Scientific). Em seguida,
22 realizou-se o protocolo de transcrição reversa, utilizando 2 µg de RNA em mix de
23 reação total de 20 µL (15 ng/µL de *primers* randômicos, 50 mM Tris-HCl, 75 mM
24 KCl, 3 mM MgCl₂, 625 µM dNTPs, 10 µM DTT e Transcriptase Reversa em Água
25 livre de nucleases, DEPC). O DNA complementar (cDNA) gerado foi diluído dez
26 vezes em água livre de nucleases DEPC e submetido a PCR quantitativa. Para
27 análises da expressão dos genes TNF-α e IL-1β foi utilizado o kit Power SYBR®
28 GREEN PCR Master Mix (Applied ® Biosystems), conforme as normas do
29 fabricante. As reações de qPCR para os genes glutaminase (Gls), transportador de
30 glutamato de alta afinidade glial (Slc1a2), RNA ZIKV e proteína ribossomal L32
31 (Rpl32) foram realizadas com o kit SYBR® GREEN (Applied ® Biosystems),
32 sendo utilizado um mix com 01 µl de tampão da enzima 10X (200 mM Tris pH 8,4;

1 500 mM KCl; 10,0% de Polietilenoglicol, 10,0% de Formamida), 05 µl de cDNA,
 2 0,2 µl de dNTP 10 mM, 0,1 µl de fluoróforo SYBR® GREEN (Applied @
 3 Biosystems), 1,4 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,2 µl do iniciador 200 nM, 0,1 µl da enzima
 4 Taq, 2,0 µl de Betaína, água livre de nucleases (Ambion®) para um volume total de
 5 10 µl. Todas as reações foram feitas utilizando-se os equipamentos StepOnePlus™
 6 Real-Time PCR Systems e QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real-Time PCR System.
 7 Prepararam-se amostras em triplicatas sendo as variações de expressão gênica dos
 8 genes alvo calculadas por $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando MOCK24h como referência.

9 Foram utilizados os seguintes genes para análise: *mus musculus* fator de
 10 necrose tumoral (TNF- α) (forward: 5'-GCTGAGCTCAAACCCTGGTA-3'; reverse:
 11 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'); *mus musculus* interleucina 1 beta (IL-1 β)
 12 (forward: 5'-GGGCCTCAAAGGAAAGAATC-3'; reverse: 5'-
 13 TACCAGTTGGGGA ACTCTGC-3'); *mus musculus* glutaminase (Gls) (forward: 5'-
 14 GGCAAAGGCATTCTATTGGA-3'; reverse: 5'-TTGGCTCCTTCCCAACATAG-
 15 3'); *mus musculus* solute carrier family 1 transportador de glutamato de alta
 16 afinidade glial (Slc1a2) (forward: 5'-ATTGGTGCAGCCAGTATTCC-3'; reverse:
 17 5'-CCAGCTCAGACTTGGAAAGG-3'); RNA ZIKV – genoma de referência
 18 contido no GenBank: KX197192 (forward: 5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3';
 19 reverse: 5'-CCACTAACGTTCTTTTGCAGAC AT-3'); *mus musculus* proteína
 20 ribossomal L32 (Rpl32) (forward: 5'-GCTGCCATCTGTTTTACGG-3'; reverse: 5'-
 21 TGACTGGTGCCTGATGAACT-3').

23 3.11 Análise de dados

24 O software GraphPadPrism® versão 7 (GraphPad Software Inc.), foi
 25 utilizado para análise de dados, e a significância estatística por teste-t não pareado,
 26 para análise de dois grupos. Para análise dos resultados do PCR quantitativo e
 27 ensaio de morte celular com mais de uma variável, utilizou-se o teste *two-way*
 28 ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Testes que obtiveram valores de $p < 0,05$,
 29 foram considerados significativos.

1 **4 RESULTADOS**

2 **4.1 Otimização do protocolo de culturas primárias de células da glia**

3 Uma vez que o presente estudo teve como principal objetivo avaliar
4 possíveis alterações celulares provocadas em células da glia pela infecção com o
5 vírus da Zika, fez-se necessário inicialmente o estabelecimento, no laboratório, de
6 um protocolo padronizado de cultivo primário de células da neuroglia. Utilizando
7 como base protocolos previamente descritos (McCarthy and de Vellis, 1980; Hamby
8 et al., 2006), foram introduzidas as modificações descritas a seguir, que
9 possibilitaram um maior rendimento na obtenção de culturas gliais. Córtices de
10 cérebros dissecados de embriões (E15/16) de camundongos C57BL/6 foram
11 homogeneizados (vide material e métodos, item 3.4) e plaqueados em frascos de
12 cultivo celular T25 tratados com poli-L-Lisina, na quantidade de 1 córtex por frasco.
13 O protocolo original sugeria a utilização de frascos T75, e esta alteração foi
14 realizada a fim de obter-se uma cultura primária com confluência máxima
15 (aproximadamente 100%) em um período mais curto de tempo, por volta de 10 dias
16 de cultivo celular. Decorrido este tempo, as culturas eram replicadas e transferidas
17 para os frascos T75 para proliferação. A segunda alteração realizada no protocolo
18 original consistiu em remover-se a etapa de tratamento com poli-L-Lisina das
19 garrafas ou placas de cultivo celular a partir do primeiro repique das culturas
20 primárias. Assim, aguardou-se que as células da glia atingissem 100% de
21 confluência e elas eram então repicadas em novos frascos para ampliação do número
22 de células até a obtenção de uma quantidade de células suficiente para realização
23 dos experimentos. Nesta etapa, as células eram finalmente plaqueadas em placas de
24 06 poços e em seguida submetidas por um período de 7 dias ao tratamento com
25 AraC, com o objetivo de se obter uma cultura predominantemente astrocitária.

26

27 **4.2 Tratamento de culturas mistas de glia com AraC**

28 As culturas primárias de células da glia foram tratadas por 07 dias com AraC
29 e posteriormente analisadas por imunofluorescência para determinação da eficácia
30 deste método na depleção de micróglias das culturas. Durante a administração da
31 droga houve a troca do meio de cultivo celular a cada dois dias e, ao final do

1 tratamento, foram realizados experimentos de imunofluorescência para avaliar a
2 quantidade de micróglia presentes em culturas tratadas e não tratadas. Embora o
3 tratamento com AraC já tenha sido descrito como eficiente na eliminação de
4 micróglia de culturas gliais (Hamby et al., 2006), nossos resultados demonstraram
5 que não houve diferença na proporção de micróglia em relação ao número total de
6 células, quando comparados os diferentes grupos experimentais. Em culturas
7 controle não tratadas com AraC observou-se uma média de $11,3 \pm 8,2$ % (168 de
8 2381, Figura 3 B) de células positivas para o marcador anti-Iba1 e, portanto,
9 classificadas como micróglia. As culturas de células tratadas por 07 dias com AraC
10 apresentaram resultados semelhantes, uma vez que a proporção de micróglia nessas
11 amostras foi de $9,53 \pm 1,96$ (519 de 5815, Figura 3 B).

12 Uma vez padronizado o protocolo de cultura primária de células da glia,
13 foram realizadas infecções destas culturas com o ZIKV. Culturas primárias de glia
14 foram infectadas com MOCK ou ZIKV de acordo com protocolo descrito no item
15 3.6 e, após 24 ou 48 horas de infecção, essas culturas foram avaliadas quanto à
16 presença de RNA viral, possíveis alterações em sua composição celular e alterações
17 na expressão de alguns genes específicos.

18

19 **4.3 Culturas primárias de células da glia apresentaram níveis significativos de** 20 **mRNA viral 24 e 48 horas após infecção**

21 Após diferenciação e ao atingirem confluência entre 90 e 100%, células da
22 glia foram transferidas para placas de 6 poços, e submetidas, posteriormente, a
23 infecção com MOCK ou ZIKV (MOI=0,1) por tempos de 24h e 48h. Em seguida,
24 analisou-se por RT-qPCR a presença de transcritos de RNA viral em todas as
25 amostras. O RNA do ZIKV foi consistentemente detectado em amostras infectadas
26 nos tempos de 24h e 48h (Figura 4).

27

28

29

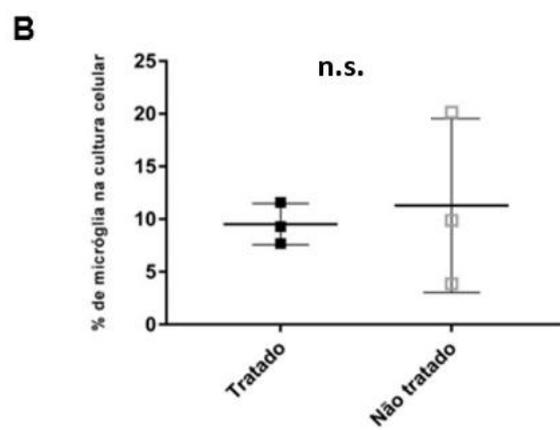
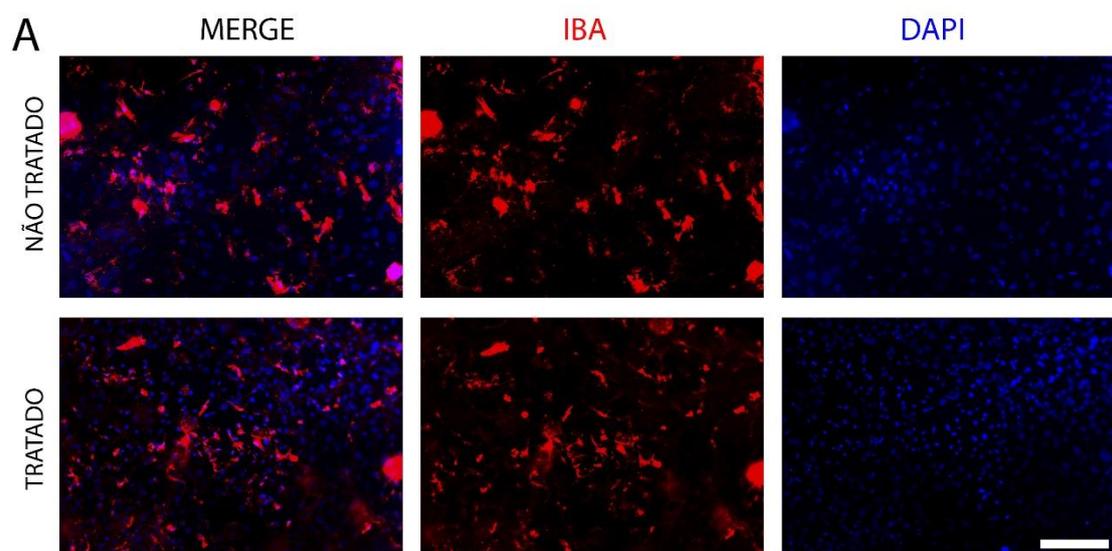


Figura 3. Tratamento com AraC não promoveu depleção de micróglias em culturas primárias de células da glia. Imagens representativas de culturas primárias de células da glia após tratamento (painéis inferiores) ou não (painéis superiores) com AraC por 07 dias (A). Anticorpo anti-Iba1 foi utilizado nas análises de imunofluorescência para marcar micróglias (apresentado em vermelho nos painéis centrais e da esquerda). Núcleos celulares foram marcados com DAPI (em azul). Os painéis da esquerda mostram a sobreposição das imagens de anti-Iba1 e DAPI. A barra de tamanho corresponde a 100 μ m em todos os painéis. Estas imagens são representativas de um total de 45 imagens adquiridas em 3 experimentos independentes. A quantificação da porcentagem de micróglias em relação ao número total de células (determinada pelo número de núcleos) em cada condição experimental está representada no gráfico em B. Os valores correspondem à média e desvio padrão obtidos com a análise de mais de 8000 células e mostram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratado (quadrados fechados) e não tratado (quadrados abertos). Análises foram realizadas utilizando-se o Teste t não pareado ($p=0,7358$).

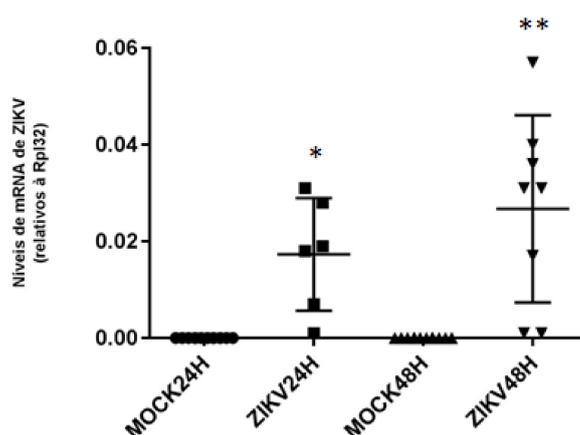


Figura 4. Expressão de mRNA de ZIKV em células da glia controle (MOCK) e infectadas (ZIKV). Células de cultura primária de glia foram infectadas com ZIKV ou controle (MOCK). O RNA foi extraído 24 e 48h após a infecção e sujeito a RT-qPCR para verificar a expressão dos níveis de mRNA de ZIKV. Pode-se observar a presença de RNA viral apenas em amostras infectadas com ZIKV nos dois tempos analisados. O método de análise utilizado foi o Teste t não pareado (MOI=0,1). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. $n=6-10$ que corresponde a diferentes poços de placas de 6 poços obtidos em 3 experimentos com culturas diferentes.

1 **4.4 A infecção com ZIKV parece não afetar proliferação celular de micróglias** 2 **em culturas de glia**

3 Culturas primárias de glia infectadas com ZIKV ou MOCK por 24 ou 48
4 horas foram analisadas por imunofluorescência para avaliar se a presença de ZIKV
5 poderia alterar a proporção de micróglias nestas culturas. Nossos resultados
6 utilizando o anticorpo anti-Iba1 (marcador de micróglias) demonstraram que não
7 houve variação significativa na proporção de células positivas para anti-Iba1,
8 quando comparadas as diferentes condições (infectado e MOCK) nos dois tempos
9 avaliados (Figura 5). Culturas de glia infectadas por ZIKV por 24 e 48 h (ZIKV24H
10 e ZIKV48H) apresentaram em média uma proporção de 10.7% e 7.3% de micróglias
11 (Figura 5 B), enquanto as culturas MOCK apresentaram em média de 11,04% e
12 13,44% nos tempos de 24 e 48 h (MOCK 24H e MOCK48H) respectivamente
13 (Figura 5 B).

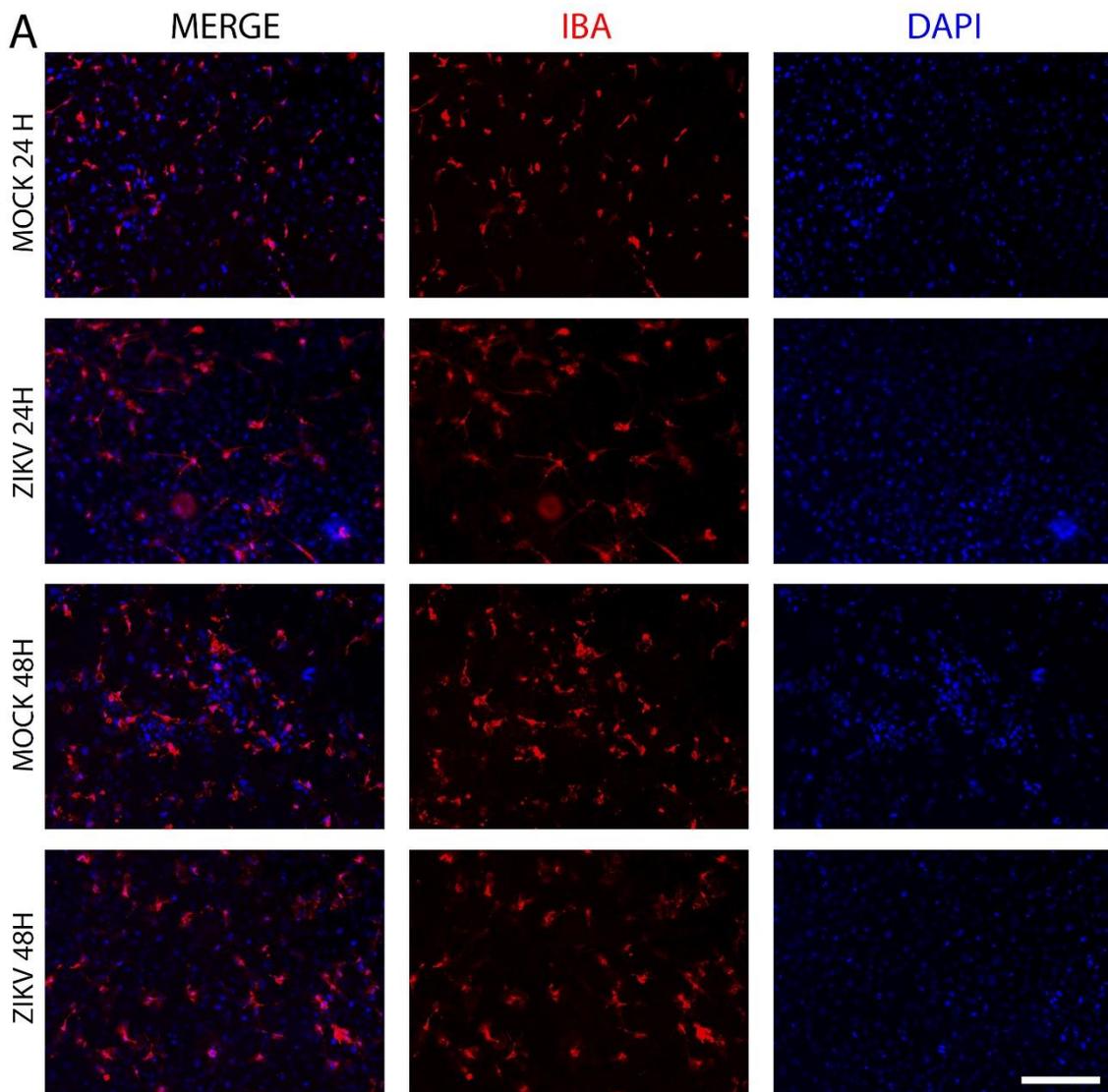
14 Análises preliminares de imunofluorescência utilizando o anticorpo S100 β
15 indicaram que não houve alteração na percentagem de astrócitos em culturas de glia
16 infectadas com ZIKV quando comparadas às culturas não infectadas. Entretanto,
17 estes resultados precisam ser confirmados e por isso não estão aqui apresentados.

19 **4.5 Células da glia infectadas com ZIKV expressam níveis significativos de** 20 **citocinas pró-inflamatórias durante o processo da infecção**

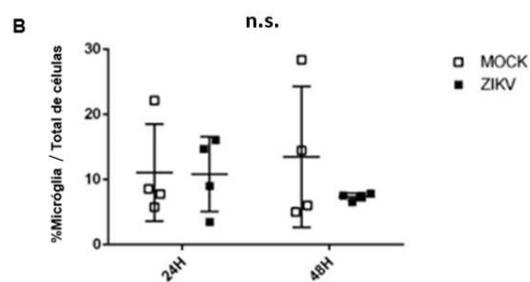
21 Embora nossos resultados não tenham demonstrado a ocorrência de
22 microgliose em culturas de glia infectadas com ZIKV, estudos recentes do nosso
23 laboratório e outros (Costa et al., 2017; Olmo et al., 2017; Lum et al., 2017)
24 demonstraram que a infecção por ZIKV pode ativar a expressão de citocinas pró-
25 inflamatórias *in vitro*. Assim, nós analisamos por RT-qPCR os níveis de RNA
26 mensageiro de IL-1 β e TNF- α em células controle (MOCK) e infectadas (ZIKV) nos
27 tempos de 24 e 48 h. Um aumento nos níveis de IL-1 β e TNF- α foi observado após
28 48h em culturas infectadas por ZIKV, quando comparadas a células não infectadas
29 (Figura 6). Diferenças significativas não foram observadas entre as diferentes
30 condições no tempo de 24 h, embora uma tendência ao aumento dos níveis de

1 mRNA de IL-1 β já possa ser observada em células infectadas com ZIKV por esse
2 tempo (Figura 6B).

3



1



2 **Figura 5. Culturas primárias de células da glia infectadas com ZIKV não apresentam microgliose.**
 3 Imagens representativas de culturas primárias de células da glia infectadas por ZIKV ou MOCK por 24
 4 ou 48 horas (de acordo com informação à esquerda dos painéis. Micróglia foram marcadas por
 5 imunofluorescência utilizando anti-Iba1 (em vermelho) e os núcleos celulares foram corados com DAPI
 6 (em azul). Os painéis da esquerda mostram a sobreposição das imagens de anti-Iba1 e DAPI. A barra de

1 tamanho corresponde a 100 μ m em todos os painéis. Estas imagens são representativas de um total de 20
 2 imagens adquiridas para cada condição experimental em 2 dias de experimentos independentes. A
 3 quantificação da porcentagem de micróglias em relação ao número total de células (determinada pelo
 4 número de núcleos) em cada condição experimental está representada no gráfico em B. Os valores
 5 correspondem à média obtida e desvio padrão e demonstram que não houve diferença estatística
 6 significativa entre os grupos MOCK24H, MOCK48H, ZIKV24H e ZIKV48H após Two-way ANOVA
 7 ($p=0,4299$).

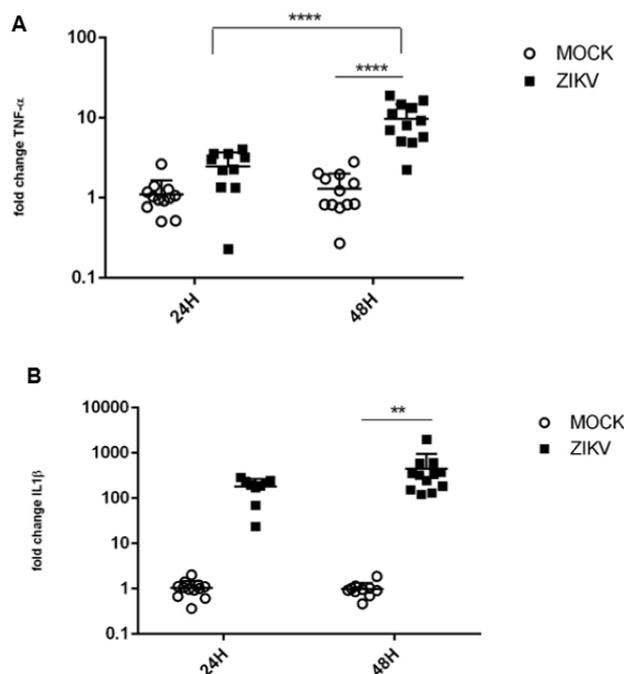


Figura 6. Infecção por ZIKV em culturas primárias de glia promove o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Células de cultura primária de glia foram infectadas com ZIKV (MOI = 0.1) ou controle (MOCK) por 24 ou 48 horas e processadas para obtenção de RNA. Análises de RT-qPCR foram realizadas para verificar a expressão dos níveis de mRNA de TNF- α (A) e IL-1 β (B) e pôde-se observar que os níveis de ambas as citocinas se apresentaram significativamente alterados em culturas infectadas (quadrados pretos) por 48 h com ZIKV quando comparadas com MOCK (esferas brancas). Os valores expressos nos gráficos foram normalizados pelo nível de expressão das amostras MOCK 24H. O método de análise utilizado foi o two-way ANOVA ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$. $n=8-12$ que corresponde a diferentes poços de placas de 6 poços obtidos em 3 experimentos com culturas diferentes.

1 **4.6 Infecção por ZIKV não altera a expressão de genes que regulam a** 2 **concentração extracelular de glutamato**

3 No cérebro, a concentração extracelular de glutamato é primariamente
4 regulada por células da glia e já foi demonstrado, *in vitro*, que altos níveis deste
5 neurotransmissor excitatório estão relacionados a processos que induzem a morte
6 neuronal causada por infecções por vírus da família Flaviviridae (Chen et al., 2012;
7 Olmo et al., 2017). Alterações nos níveis de mRNA de glutaminase, enzima
8 responsável pela síntese de glutamato a partir de glutamina, e transportadores de
9 glutamato, expressos respectivamente em micróglia e astrócitos, já foram
10 observados em células da glia infectadas com JEV, *in vitro* (Chen et al., 2012) .
11 Assim, no presente trabalho nós analisamos por RT-qPCR os níveis de expressão de
12 genes que regulam a via do glutamato, em culturas primárias de glia infectadas por
13 ZIKV após os períodos de 24 e 48 horas. Nossos resultados indicam que não houve
14 alterações nos níveis de glutaminase e transportador de glutamato de alta afinidade
15 glial (Slc1a2) em células infectadas com ZIKV, quando comparadas com o MOCK,
16 nos tempos analisados (Figura 7).

17 18 **4.7 Meio condicionado de culturas primárias de células da glia infectadas com** 19 **ZIKV não induz morte celular em culturas primárias de neurônios**

20 Resultados recentes do nosso laboratório indicaram que o aumento nos
21 níveis de IL-1 β e TNF- α podem regular processos celulares que levam à morte
22 neuronal (Olmo et al., 2017) . Uma vez que nossas análises, neste presente trabalho,
23 demonstraram aumento nos níveis de mRNA para IL-1 β e TNF- α em culturas
24 primárias de glia infectadas por ZIKV por 48 horas, nós decidimos investigar se o
25 meio de cultura condicionado, obtido destas células seria capaz de provocar morte
26 celular em culturas primárias de neurônios. Para isso foi realizado um ensaio de
27 viabilidade celular descrito anteriormente (Doria et al., 2013), no qual culturas
28 primárias de córtices neuronais de embriões (E15/16) de camundongos C57BL/6
29 tipo selvagem, diferenciadas por 07 dias, foram tratadas (vide material e métodos,
30 item 3.7). Seis condições experimentais foram utilizadas para determinar se fatores

1 não virais, liberados por células da glia infectadas com o ZIKV poderiam estimular
 2 morte

3

4

5

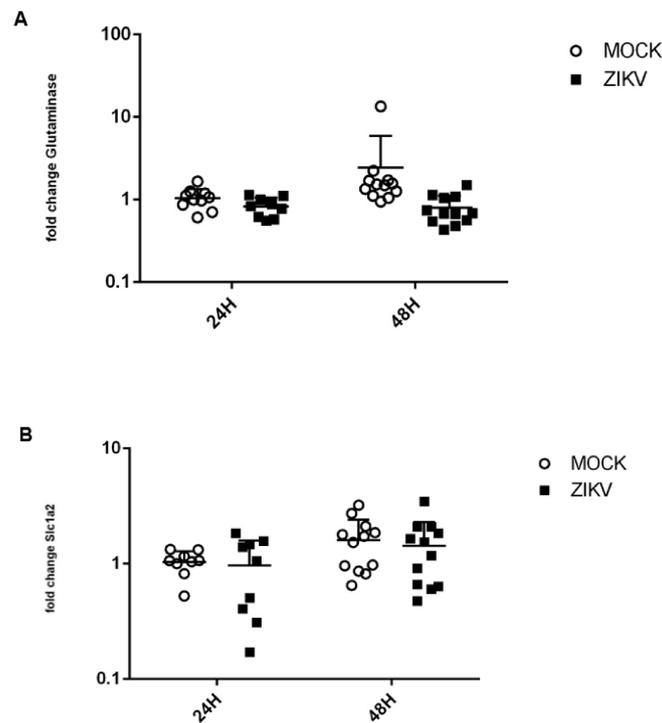
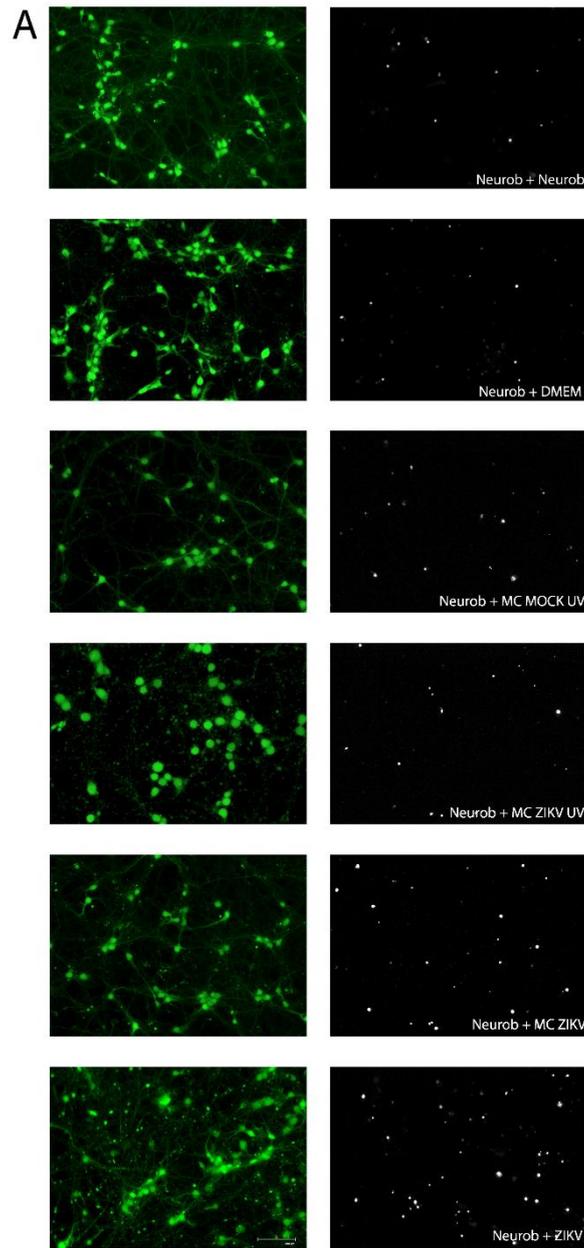


Figura 7. Infecção por ZIKV em culturas primárias de glia não altera a expressão de Glutaminase e Slc1a2. Células de cultura primária de glia foram infectadas com ZIKV (MOI = 0.1) ou controle (MOCK) por 24 ou 48 horas e processadas para obtenção de RNA. Análises de RT-qPCR foram realizadas para verificar a expressão dos níveis de mRNA de glutaminase (A) e transportador de glutamato de alta afinidade glial (Slc1a2) (B). Os valores expressos nos gráficos para amostras infectadas por ZIKV (quadrados pretos) e MOCK (esferas brancas) foram normalizados pelo nível de expressão das amostras MOCK 24H. O método de análise utilizado foi o two-way ANOVA que demonstrou não haver diferenças entre as condições e os tempos avaliados. n=8-12 que corresponde a diferentes poços de placas de 6 poços obtidos em 3 experimentos com culturas diferentes.

6

1 neuronal. O meio condicionado era removido das culturas primárias de glia
2 infectadas por 48h com ZIKV ou MOCK e imediatamente acondicionados em
3 freezer -80°C. Em duas das condições analisadas, imediatamente antes da adição do
4 meio condicionado às culturas neuronais, estes meios de cultura eram tratados com
5 irradiação UV para inativar partículas virais. Outros dois controles eram ainda
6 utilizados para analisar a viabilidade de células neuronais após a adição de meio de
7 cultivo celular específico de glia, DMEM. Em todas as condições onde o meio
8 condicionado foi adicionado às culturas neuronais, a proporção foi de 1:1 entre o
9 meio condicionado e o meio de cultivo neuronal (Neurobasal acrescido de fatores,
10 conforme descrito nos métodos). As seis condições experimentais analisadas estão
11 descritas a seguir.

12 Tratamento de culturas primárias de neurônios com: meio Neurobasal
13 (condição 01), DMEM High Glucose (condição 02), meio condicionado de células
14 da glia não infectadas (MOCK) inativado por UV (condição 03), meio condicionado
15 de células da glia infectadas com ZIKV inativado por UV (condição 04), meio
16 condicionado de células da glia infectadas com ZIKV não inativado por UV
17 (condição 05) e meio contendo partículas virais de ZIKV (condição 06). Após o
18 tratamento das células neuronais nessas condições experimentais por 24 horas,
19 realizou-se o ensaio de morte celular adicionando-se às culturas uma solução
20 contendo 02 µM de calceína-AM e 02 µM de homodímero de etídeo por 15 minutos
21 a fim de se detectar as células viáveis (marcadas por calceína-AM) e mortas
22 (permeáveis e marcadas pelo homodímero de etídeo). Nossos resultados
23 demonstraram que apenas a condição 06, onde os neurônios foram tratados com
24 partículas virais viáveis, foi capaz de apresentar um aumento nos níveis de morte
25 neuronal (Figura 8).



B Tratamento com meio condicionado de células da glia infectadas com ZIKV

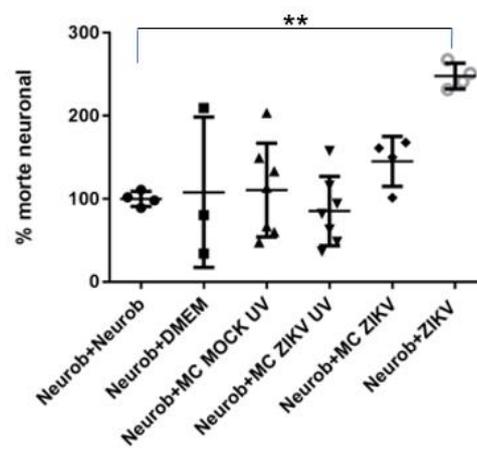


Figura 8. Meio condicionado de culturas de glia infectadas por ZIKV não induz morte neuronal.

Culturas primárias neuronais de córtices de camundongos C57BL/6 foram submetidas ao tratamento com 06 sobrenadantes diferentes. Meio Neurobasal, DMEM High Glucose, Meio condicionado de células da glia infectadas com MOCK inativado por UV, Meio condicionado de células da glia infectadas com ZIKV inativado por UV, Meio condicionado de células da glia infectadas com ZIKV, ZIKV. Após 24 horas de incubação, as culturas de neurônios foram submetidas ao ensaio de morte celular que consiste no tratamento com as soluções de calceína-AM (verdes, células vivas) e homodímero de etídeo (branco, células mortas) por 15 minutos. As imagens obtidas foram quantificadas utilizando o programa ImageJ e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Prism Graphpad® Não foi observada diferença significativa entre os grupos após realização de One-way ANOVA. Teste t comparando os grupos mostrou diferença significativa entre as condições 1 e 6 ** $p < 0,01$ Barra de tamanho corresponde a 100 μm em todas as imagens. $n=3-7$ que corresponde a diferentes poços de placas de 4 poços obtidos em 3 experimentos com culturas diferentes.

1 **DISCUSSÃO**

2 Culturas celulares monotípicas são amplamente utilizadas como modelo *in vitro*
3 para investigar funções específicas de determinados tipos celulares (Hertz et al., 1998).
4 Diferentes estratégias já foram desenvolvidas, até o presente momento, para obtenção
5 de culturas enriquecidas de astrócitos e entre elas, destacam-se a utilização de agitação
6 de culturas primárias de glia em shaker orbital (McCarthy and de Vellis, 1980), o uso de
7 toxinas específicas para depleção de micróglias (Giulian and Baker, 1986), a subcultura de
8 astrócitos (McCarthy and de Vellis, 1980) e a combinação destes diferentes métodos
9 (Schildge et al., 2013). Não obstante, alguns autores discutem as implicações do uso de
10 shaker ou outras manipulações manuais por longos períodos, pois esses métodos
11 poderiam induzir modificações fenotípicas e morfológicas nas células, além de
12 aumentarem o risco de contaminação e morte celular devido ao estresse (Tamashiro et
13 al., 2012; Roy, 2018). Assim sendo, existe ainda um grande interesse no desenvolvimento
14 de novas estratégias para separar os diferentes tipos celulares da neuróglia.

15 Os resultados do presente trabalho demonstraram que não houve eficácia no
16 tratamento de culturas mistas de glia com o reagente AraC por 07 dias para a eliminação
17 de micróglias e enriquecimento de astrócitos. Experimentos complementares necessitam
18 ser realizados para comprovar a viabilidade e atividade do estoque de AraC utilizado,
19 uma vez que, a proporção de micróglias em culturas tratadas e não tratadas não
20 apresentou diferença significativa ao final do período. Assim sendo, a viabilidade desse
21 composto poderia ser futuramente testada, ao realizarem-se tratamento com diferentes
22 concentrações de AraC em culturas de células da glia. E, a partir dos resultados desses
23 experimentos de concentração resposta, determinar a concentração mínima efetiva de
24 AraC para depleção das micróglias. Entretanto, vale ressaltar que até o momento, apesar
25 das modernas metodologias desenvolvidas em diferentes laboratórios, ainda não foi
26 descrito um protocolo que permitisse o estabelecimento de uma cultura astrocitária livre
27 de micróglias. Além disso, *in vivo*, as células do SNC possuem uma intensa relação de
28 interdependência funcional, e até mesmo física, o que possivelmente tornaria anômala a
29 presença de apenas um único tipo celular neste tecido (Hertz et al., 1998). Assim, muito
30 embora fosse interessante para o nosso estudo avaliar as consequências da infecção do
31 ZIKV em um único tipo celular, existem algumas vantagens em se utilizar uma cultura
32 contendo vários tipos de células da glia. Por exemplo, a viabilidade das culturas, em
33 geral, é superior quando da presença de mais de um tipo celular, mesmo em baixa

1 frequência (Hertz et al., 1998). Por isso, decidiu-se prosseguir com os experimentos
2 utilizando-se culturas mistas de glia, as quais contém astrócitos, micróglia e,
3 possivelmente, oligodendrócitos, muito embora não tenhamos utilizado anticorpos para
4 a identificação desse último tipo celular.

5 Como as células da glia, principalmente os astrócitos e as micróglia, estão
6 sendo apontados como participantes ativos de eventos patológicos do SNC (Liu et al.,
7 2011), torna-se relevante o estudo das alterações de seus estados morfofisiológicos em
8 função da infecção pelo ZIKV. Os astrócitos podem se tornar reativos pela ação de
9 fatores inflamatórios secretados por micróglia ativadas e, conseqüentemente, sofrer
10 alterações morfofisiológicas, tais como aumento do corpo celular e do número de
11 ramificações (Liddelow et al., 2017; Li et al., 2019). Além disso, o aumento no número de
12 astrócitos, ou astrocitose, é uma conseqüência comum ao processo neuroinflamatório
13 (Zamanian et al., 2012). Micróglia podem ser ativadas tanto devido à presença de um
14 microrganismo, quanto em função de processos neurodegenerativos (Kreutzberg, 1996;
15 Pocock and Liddle, 2001). Quando ativadas, as micróglia alteram sua morfologia,
16 passando a apresentar um corpo celular maior e processos ameboides, o que contrasta
17 com seu estado quiescente, quando essas células apresentam corpo celular pequeno e
18 ramificações alongadas e estreitas (Kreutzberg, 1996). Além disso, durante o processo
19 inflamatório essas micróglia se multiplicam e passam a secretar citocinas e outros
20 fatores inflamatórios (Liddelow et al., 2017). Essa ativação microglial é importante por
21 promover a destruição de microorganismos, remoção de células em processo de morte
22 ou mortas, e liberação de fatores de crescimento para regeneração tecidual (Kreutzberg,
23 1996; Pocock and Liddle, 2001). Entretanto, um processo de ativação astrocitária e
24 microglial exacerbados podem se tornar nocivos ao SNC, levando a um aumento da
25 neurodegeneração.

26 No caso da infecção pelo ZIKV, já foi demonstrado que a presença deste vírus
27 no SNC leva a um aumento do número de astrócitos e micróglia e a uma elevação de
28 diversos fatores inflamatórios, incluindo TNF- α , IL1- β , IL-6, CCL2, CXCL10, entre
29 outros (Costa et al., 2017; Olmo et al., 2017; Khaiboullina et al., 2019; Gutierrez Sanchez et
30 al., 2019). Além disso, um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias também é
31 observado em pacientes (Foo et al., 2018; Ornelas et al., 2017; Naveca et al., 2018).
32 Interessantemente, em um estudo feito com tecido fetal acometido por ZIKV, Mlakar e
33 colaboradores (2016) observaram ampla ativação astrocítica e microglial no espaço

1 subaracnóideo, córtex e matéria branca subcortical. Em outra investigação também foi
2 relatado que o ZIKV é capaz de infectar células microgliais, levando a um aumento dos
3 níveis de expressão de mediadores pró-inflamatórios (Lum et al., 2017). Os resultados
4 desse nosso estudo não mostraram diferença significativa entre o número de células
5 presentes nas culturas infectadas com ZIKV ou MOCK em nenhum dos tempos
6 estudados. Entretanto, aparentemente, as células microgliais MOCK parecem estar em
7 estado de repouso, com maiores ramificações e corpo celular menor, quando comparado
8 às células microgliais infectadas com ZIKV, as quais parecem possuir maior corpo
9 celular e ramificações menores, aparentando perfil ativado. Entretanto, análises
10 morfológicas pormenorizadas seriam necessárias para confirmar esses achados. Além
11 disso, corroborando a hipótese de que a infecção pelo ZIKV levaria a uma ativação das
12 células da glia também *in vitro*, os resultados deste estudo demonstram que a infecção
13 pelo ZIKV leva a um aumento da expressão de TNF- α e IL-1 β , especialmente 48 horas
14 após a infecção.

15 Nossos resultados demonstraram a presença de RNA do ZIKV nas culturas de
16 células da glia nos tempos de 24 e 48 horas, confirmando outros dados da literatura que
17 já haviam reportado a capacidade infectiva do Zika nesse tipo celular (Lum et al., 2017;
18 Meertens et al., 2017). A consequências da infecção de células da glia pelo ZIKV podem
19 ser várias, como é o caso de outros flavivírus estudados anteriormente. Por exemplo,
20 segundo Potokar e colaboradores (2014), o TBEV, um flavivírus da família do ZIKV, é
21 altamente internalizado por astrócitos, muito embora não tenha sido capaz de induzir
22 alteração significativa na viabilidade dessas células. A hipótese dos autores desse
23 trabalho é que os astrócitos poderiam estar atuando como reservatórios virais ou que
24 essa infecção poderia causar uma modificação na resposta imune ou uma baixa
25 sinalização para o combate ao agente infeccioso (Potokar et al., 2014). Adicionalmente,
26 outro exemplo a ser reportado foi o trabalho de Chen e colaboradores (2012) no qual o
27 fator inflamatório TNF- α , teve seus níveis de expressão aumentados em decorrência da
28 infecção por JEV em células da glia e neurônios. A propósito, neste mesmo estudo,
29 também foi demonstrado que a infecção viral em micróglia e astrócitos promoveu
30 alterações na produção, liberação e recaptação do neurotransmissor excitatório
31 glutamato, o que induziu um efeito excitotóxico e consequente morte neuronal (Chen et
32 al., 2012) . Assim, mais estudos serão necessários para determinar como a infecção das
33 células da glia pelo ZIKV afeta a homeostase do SNC e contribui para as alterações

1 neurológicas desencadeadas por esse vírus. É possível que uma combinação entre
2 estudos *in vivo* e *in vitro* seja importante para elucidar os mecanismos moleculares
3 envolvidos. Nesse sentido, esse trabalho fornece os primeiros passos para a realização
4 de estudos mais aprofundados utilizando-se culturas primárias de células da glia.

5 Durante a neurotransmissão, ocorrem alterações nas concentrações do
6 neurotransmissor glutamato na fenda sináptica, sendo que para o término da sinalização
7 intercelular sejam necessários meios de remoção dessa molécula, como a difusão e
8 captação mediada por transportadores celulares (Allen, 2014). Essas alterações se dão,
9 principalmente, devido ao fato de que tanto células da glia, como os astrócitos e
10 micróglia, quanto os neurônios são capazes de liberar glutamato no tecido neural (Gorg
11 et al., 2010; Chen et al., 2012; Olmo et al., 2017). Em contrapartida, já foi demonstrado por
12 vários estudos que o acúmulo extracelular desse neurotransmissor pode ocasionar a
13 superativação de seus receptores, excitotoxicidade e morte neuronal (Choi, 1994; Gorg et
14 al., 2010; Takeuchi et al., 2006). Além disso, já foi demonstrado que a glutaminase,
15 enzima responsável por converter glutamina em glutamato, é uma proteína essencial
16 para a manutenção dos níveis celulares desse aminoácido (Takeuchi et al., 2006).
17 Adicionalmente, demonstrou-se também que o TNF- α é capaz de induzir o aumento da
18 expressão da glutaminase e diminuir a recaptação de glutamato, aumentando assim os
19 níveis extracelulares desse neurotransmissor (Takeuchi et al., 2006; Chen et al., 2012).
20 Ademais, observou-se em um trabalho com células da glia infectadas por JEV, um
21 flavivírus neurotrópico, um aumento na expressão da glutaminase e dos transportadores
22 de aminoácidos excitatórios (Chen et al., 2012). E, apesar de ter sido observado um
23 aumento nos níveis de expressão dos transportadores de glutamato, a atividade de
24 captação desse neurotransmissor foi inibida de forma significativa pela citocina TNF- α
25 (Chen et al., 2012). Em relação ao ZIKV, estudos anteriores do nosso grupo
26 demonstraram que o glutamato tem uma função primordial na morte neuronal induzida
27 por esse vírus, uma vez que o bloqueio dos receptores do tipo NMDA evitam a morte de
28 neurônios expostos ao vírus (Costa et al., 2017; Olmo et al., 2017). Assim, uma das nossas
29 hipóteses seria que o ZIKV, assim como o JEV, alteraria a expressão de genes
30 importantes para a regulação dos níveis de glutamato extracelular. Entretanto, os
31 resultados do presente estudo demonstraram que a infecção de células da glia pelo
32 ZIKV não altera a expressão da glutaminase e do transportador de glutamato. Assim,
33 podemos inferir que as alterações recorrentes na via do glutamato advindas da infecção

1 de ZIKV em células da glia podem depender de mecanismos ainda não esclarecidos e
2 que necessitam de mais investigações, as quais poderiam auxiliar no entendimento da
3 patogênese viral.

4 Uma das principais hipóteses que levaram ao desenvolvimento desse trabalho é
5 que os fatores inflamatórios liberados pela glia iriam promover um aumento da morte
6 neuronal. Essa hipótese se baseia em um trabalho publicado anteriormente por nosso
7 grupo, onde demonstramos que o ZIKV é capaz de promover morte neuronal de
8 maneira não autônoma nas fases iniciais da infecção, devido à liberação de glutamato e
9 fatores inflamatórios (Olmo et al., 2017). Entretanto, os experimentos utilizando meio
10 condicionado de culturas de glia infectadas com o ZIKV não diminuíram a viabilidade
11 de neurônios murinos em cultura primária. Entretanto, resultados obtidos por Wang e
12 colaboradores (2018) demonstraram a inibição da diferenciação de células progenitoras
13 neuronais (NPCs) por tratamento com meio condicionado de células da glia infectada
14 por ZIKV contendo TNF- α , IL-1 β , IL-6 e enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)
15 por 72 horas. Também é importante ressaltar que em nosso trabalho os neurônios foram
16 incubados com meio condicionado de cultura de glia por apenas 24 horas. Estudos
17 anteriores do nosso grupo demonstram que a morte neuronal induzida por ZIKV é
18 bastante baixa 24 horas após a infecção, muito embora se mostre bastante exacerbada 72
19 horas depois (Costa et al., 2017; Olmo et al., 2017). Assim, mais experimentos devem ser
20 realizados incubando-se as culturas neuronais por períodos mais longos do que 24
21 horas. Além disso, seria interessante analisarmos a diferenciação neuronal, como
22 investigado anteriormente (Wang et al., 2018). Logo, o desenvolvimento desse modelo *in*
23 *vitro* irá permitir a avaliação dos fatores inflamatórios que são importantes para a morte
24 neuronal, uma vez que se poderá utilizar bloqueadores deles para se avaliar a
25 consequência de suas ações sobre a viabilidade neuronal.

1 5 CONCLUSÃO

2 Os resultados do presente estudo demonstram que o ZIKV é capaz de infectar
3 células da glia em cultura primária, fornecendo uma opção de modelo *in vitro* para o
4 estudo da neuropatogenicidade do ZIKV. A infecção das culturas de células da glia
5 promoveu um aumento de citocinas inflamatórias, muito embora não tenha promovido
6 gliose. Não se observou um aumento da morte neuronal devido à incubação das culturas
7 primárias neuronais com meio condicionado da glia por 24 horas. Entretanto, objetiva-
8 se realizar novos experimentos visando avaliar se a incubação por um período mais
9 prolongado poderia afetar a viabilidade, bem como a diferenciação neuronal. Assim, o
10 presente trabalho fornece um modelo *in vitro* que poderá ser interessante para o estudo
11 das consequências da infecção do ZIKV em diferentes células do SNC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, N. J. 2014. Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 439-63.
- BRASIL, P. *et al.* 2016. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*, 375, 2321-2334.
- BRAULT, J. B. *et al.* 2016. Comparative Analysis Between Flaviviruses Reveals Specific Neural Stem Cell Tropism for Zika Virus in the Mouse Developing Neocortex. *EBioMedicine*, 10, 71-6.
- CALVET, G. *et al.* 2016. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*, 16, 653-660.
- CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* 2016. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*, 387, 1531-1539.
- CHEN, C. J. *et al.* 2012. Glutamate released by Japanese encephalitis virus-infected microglia involves TNF-alpha signaling and contributes to neuronal death. *Glia*, 60, 487-501.
- CHOI, D. W. 1994. Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog Brain Res*, 100, 47-51.
- COSTA, V. V. *et al.* 2017. N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptor Blockade Prevents Neuronal Death Induced by Zika Virus Infection. *MBio*, 8.
- CUGOLA, F. R. *et al.* 2016. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534, 267-71.
- DICK, G. W. *et al.* 1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 46, 509-20.
- DORIA, J. G. *et al.* 2013. Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease. *Br J Pharmacol*, 169, 909-21.
- DUFFY, M. R. *et al.* 2009. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*, 360, 2536-43.

- FAGBAMI, A. H. 1979. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J Hyg (Lond)*, 83, 213-9.
- FOO, S. S. *et al.* 2018. Biomarkers and immunoprofiles associated with fetal abnormalities of ZIKV-positive pregnancies. *JCI Insight*, 3.
- FOY, B. D. *et al.* 2011. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*, 17, 880-2.
- FRICKER, M. *et al.* 2018. Neuronal Cell Death. *Physiol Rev*, 98, 813-880.
- GEBICKE-HAERTER, P. J. 2001. Microglia in neurodegeneration: molecular aspects. *Microsc Res Tech*, 54, 47-58.
- GIULIAN, D. & BAKER, T. J. 1986. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci*, 6, 2163-78.
- GORG, B. *et al.* 2010. Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. *Glia*, 58, 691-705.
- GUTIERREZ SANCHEZ, L. A. *et al.* 2019. Zika virus infection: A correlation between prenatal ultrasonographic and postmortem neuropathologic changes. *Neuropathology*.
- HAMBY, M. E. *et al.* 2006. Characterization of an improved procedure for the removal of microglia from confluent monolayers of primary astrocytes. *J Neurosci Methods*, 150, 128-37.
- HANISCH, U. K. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40, 140-55.
- HASTINGS, A. K. *et al.* 2017. TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Rep*, 19, 558-568.
- HAYES, E. B. 2009. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis*, 15, 1347-50.
- HERTZ, L. *et al.* 1998. Functional studies in cultured astrocytes. *Methods*, 16, 293-310.
- HUANG, Y. *et al.* 2018. Zika virus propagation and release in human fetal astrocytes can be suppressed by neutral sphingomyelinase-2 inhibitor GW4869. *Cell Discov*, 4, 19.
- KHAIBOULLINA, S. F. *et al.* 2019. Host Immune Response to ZIKV in an Immunocompetent Embryonic Mouse Model of Intravaginal Infection. *Viruses*, 11.

- KREUTZBERG, G. W. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312-8.
- LETA, S. *et al.* 2018. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int J Infect Dis*, 67, 25-35.
- LI, C. *et al.* 2016. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell*, 19, 672.
- LI, K. *et al.* 2019. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis*, 10, 664-675.
- LIANG, Q. *et al.* 2016. 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*, 19, 663-671.
- LIDDELOW, S. A. *et al.* 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541, 481-487.
- LIU, W. *et al.* 2011. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci*, 89, 141-6.
- LUM, F. M. *et al.* 2017. Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces Inflammation. *Clin Infect Dis*, 64, 914-920.
- MAGORO, T. *et al.* 2019. IL-1beta/TNF-alpha/IL-6 inflammatory cytokines promote STAT1-dependent induction of CH25H in Zika virus-infected human macrophages. *J Biol Chem*, 294, 14591-14602.
- MARTINES, R. B. *et al.* 2016. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet*, 388, 898-904.
- MCCARTHY, K. D. & DE VELLIS, J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, 85, 890-902.
- MEERTENS, L. *et al.* 2017. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep*, 18, 324-333.
- MILNER, R. & CAMPBELL, I. L. 2002. Cytokines regulate microglial adhesion to laminin and astrocyte extracellular matrix via protein kinase C-dependent activation of the alpha6beta1 integrin. *J Neurosci*, 22, 1562-72.

- MINER, J. J. *et al.* 2016. Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. *Cell Rep*, 16, 3208-3218.
- MLAKAR, J. *et al.* 2016. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*, 374, 951-8.
- NACCACHE, S. N. *et al.* 2016. Distinct Zika Virus Lineage in Salvador, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 22, 1788-92.
- NAVECA, F. G. *et al.* 2018. Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 113, e170542.
- OEHLER, E. *et al.* 2014. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill*, 19.
- OLMO, I. G. *et al.* 2017. Zika Virus Promotes Neuronal Cell Death in a Non-Cell Autonomous Manner by Triggering the Release of Neurotoxic Factors. *Front Immunol*, 8, 1016.
- OLSON, J. G. *et al.* 1981. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 75, 389-93.
- ORNELAS, A. M. *et al.* 2017. Immune activation in amniotic fluid from Zika virus-associated microcephaly. *Ann Neurol*, 81, 152-156.
- PERERA-LECOIN, M. *et al.* 2013. Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses*, 6, 69-88.
- POCOCK, J. M. & KETTENMANN, H. 2007. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci*, 30, 527-35.
- POCOCK, J. M. & LIDDLE, A. C. 2001. Microglial signalling cascades in neurodegenerative disease. *Prog Brain Res*, 132, 555-65.
- POTOKAR, M. *et al.* 2014. Tick-borne encephalitis virus infects rat astrocytes but does not affect their viability. *PLoS One*, 9, e86219.
- RANSOHOFF, R. M. & CARDONA, A. E. 2010. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, 468, 253-62.

REALI, C. *et al.* 2005. S100b counteracts effects of the neurotoxicant trimethyltin on astrocytes and microglia. *J Neurosci Res*, 81, 677-86.

ROY, J. 2018. Primary microglia isolation from mixed cell cultures of neonatal mouse brain tissue. *Brain Res*, 1689, 21-29.

SAURA, J. *et al.* 2005. Adenosine A2A receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. *J Neurochem*, 95, 919-29.

SCHILDGE, S. *et al.* 2013. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *J Vis Exp*.

SCHULER-FACCINI, L. *et al.* 2016. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 65, 59-62.

SHRIKANT, P. & BENVENISTE, E. N. 1996. The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J Immunol*, 157, 1819-22.

TAKEUCHI, H. *et al.* 2006. Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem*, 281, 21362-8.

TAMASHIRO, T. T. *et al.* 2012. Primary microglia isolation from mixed glial cell cultures of neonatal rat brain tissue. *J Vis Exp*, e3814.

TANG, H. *et al.* 2016. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*, 18, 587-90.

WANG, J. *et al.* 2018. Zika virus infected primary microglia impairs NPCs proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 497, 619-625.

WEAVER, S. C. *et al.* 2018. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu Rev Med*, 69, 395-408.

ZAMANIAN, J. L. *et al.* 2012. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*, 32, 6391-410.

ZOU, J. Y. & CREWS, F. T. 2005. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain Res*, 1034, 11-24.

