



Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Neurociências
Instituto de Ciências Biológicas

Tese de Doutorado

**Mecanismos celulares envolvidos na morte e neuroproteção de
neurônios primários infectados pelo
vírus da Zika**

Isabella Guimarães Olmo

Belo Horizonte/MG
4 de setembro de 2018

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Neurociências
Instituto de Ciências Biológicas

Mecanismos celulares envolvidos na morte e neuroproteção de
neurônios primários infectados pelo
vírus da Zika

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Neurociências da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito para obtenção do título de
Doutor em Neurociências, pela Universidade Federal
de Minas Gerais.

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola M. Ribeiro

Belo Horizonte/MG
4 de setembro de 2018

042

Olmo, Isabella Guimarães.

Mecanismos celulares envolvidos na morte e neuroproteção de neurônios primários infectados pelo vírus da Zika [manuscrito] / Isabella Guimarães Olmo. - 2018.

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

Orientador: Fabíola Mara Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Neurociências - Teses. 2. Arbovirus - Teses. 3. Doenças do sistema nervoso - DeCS. 4. Degeneração neural - DeCS. I. Ribeiro, Fabíola Mara. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8

SUMÁRIO

<i>AGRADECIMENTOS</i>	<i>V</i>
<i>COLABORAÇÕES</i>	<i>VI</i>
<i>LISTA DE ABREVIACÕES</i>	<i>VII</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>IX</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>X</i>
<i>RESUMO</i>	<i>XI</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>XIII</i>
<i>RELEVANCIA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO</i>	<i>XV</i>
<i>1. INTRODUÇÃO</i>	<i>16</i>
1.1 ZIKV: aspectos epidemiológicos	16
1.2 ZIKV: Características gerais e neurotropismo associados ao ZIKV	18
1.3 ZIKV: Vulnerabilidade das células neuronais	22
1.4 Receptores de NMDA: Aspectos gerais e vias biológicas	24
1.5 Receptores de NMDA: Excitotoxicidade	26
1.6 Receptores de NMDA: Alvos terapêuticos	28
<i>2. OBJETIVOS</i>	<i>31</i>
2.1 Objetivos gerais	31
2.2 Objetivos específicos	31
<i>3. METODOLOGIA</i>	<i>32</i>
3.1 Camundongos	32
3.2 Vírus	32
3.3 Cultivo primário de células	32
1- Cultivo primário de neurônios	32
2- Cultivo primário de células da glia	33
3.4 Infecção viral e tratamento das células	33
1- Meio condicionado	34
2- Inativação do vírus	34
3.5 Ensaio de viabilidade celular	34
3.6 Ensaio de liberação de glutamato	35
3.7 Aferição da concentração de Ca ²⁺ intracelular	36

3.8 Ensaio de imunoblot de proteínas (Western Blot)	36
3.9 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	37
3.10 Ensaio de Imunofluorescência	38
3.11 Ensaio de PCR em tempo real (RT-qPCR).....	39
1- Coleta das amostras de cultura de células	39
2- Extração do RNA total	39
3- Transcrição reversa (RT-PCR)	40
4- Desenho dos iniciadores	41
5- PCR quantitativo.....	42
3.12 Análise dos dados	42
4. <i>RESULTADOS</i>	43
4.1 Modelo experimental da infecção pelo ZIKV em cultura primária de neurônios	43
4.2 O ZIKV induz a apoptose neuronal através de um mecanismo não-autônomo.....	46
4.3 O vírus da Zika induz a morte neuronal via ativação do GluN2B.....	50
4.4 Fatores pró-inflamatórios facilitam a excitotoxicidade induzida pelo ZIKV	59
5. <i>DISCUSSÃO</i>	66
5.1 O ZIKV induz a apoptose neuronal de maneira não-autônoma.....	66
5.2 Mecanismos de sobrevivência celular e neurodegeneração mediados pelo NMDAR e o ZIKV	71
5.3 Indução da expressão de TNF- α e IL-1 β por neurônios infectados com o ZIKV	74
5.4 As citocinas TNF- α e IL- β sensibilizam os NMDARs e desencadeiam a morte neuronal	76
6. <i>CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	78
7. <i>BIBLIOGRAFIA</i>	80
7.1 Bibliografias não indexadas (folhetins de órgãos de saúde mundiais)	80
7.2 Bibliografias indexadas.....	80

AGRADECIMENTOS

Durante o período de estágio, mestrado e doutorado que realizei no Laboratório de Neurobioquímica, percebi que o trabalho científico é fundamentalmente coletivo. Portanto, tive o privilégio de conhecer e participar da equipe liderada pela professora Fabíola, que me orientou durante todo este período, sempre compromissada com o meu amadurecimento científico.

Além do mais, contei com o convívio de colegas extraordinários, a quem tenho um especial sentimento de gratidão, pois a partir das experiências vividas e compartilhadas na bancada, na sala dos estudantes e na hora do café entendemos que o conhecimento se constrói sob a luz de várias idéias. Gostaria de fazer um agradecimento especial às minhas colegas Juliana Dória e Leidiane, que me receberam de braços abertos no laboratório de Neurobioquímica, além de Jéssica Mabele e Toniana com quem trabalho até os dias de hoje. Agradeço também a Manu, Luciana de Melo, Paula, Flavinha, Isaque, Eric, Lúcio, Jumps e Álvaro, por todas as nossas conversas, discussões científicas ou não. Nós estivemos juntos, construindo algo que não sei ao certo como definir, mas que sem dúvida fica a confiança e o carinho próprios de uma grande amizade.

Agradeço ao meu marido Roenick, sempre me incentivando a continuar com os meus objetivos e a minha mãe, Mariza, que está sempre ao meu lado.

COLABORAÇÕES

Para a realização deste trabalho nós desenvolvemos colaborações entre diversos laboratórios, e o resultado foi um esforço que sempre convergiu para o auxílio mútuo e valiosa troca de experiências. Com o Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, vinculado ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG e liderado pelo Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira, nós obtivemos o Zika vírus e um amplo suporte técnico. Com o laboratório de Neurofarmacologia, vinculado ao Departamento Farmacologia da UFMG e liderado pela Dra. Luciene Viera, nós realizamos ensaios de avaliação de cálcio intracelular e liberação de glutamato. Por último, nós estabelecemos uma relação científica muito proveitosa, que nos auxiliou a compreender melhor os nossos resultados, com os pesquisadores Profa. Dra. Vivian V. Costa, Dra. Juliana F. da Silva e Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira e Prof. Dr. João Trindade Marques. Neste período aprendi sobre ensaios de infecção *in vitro*, ensaios moleculares de detecção do vírus, ensaios de viabilidade celular. Mantive, durante todo o tempo, uma relação próxima com nossos colaboradores, participando ativamente dos experimentos e aprendendo com os ensaios de avaliação da expressão proteica por imunoblotting e imunofluorescência, além dos ensaios de detecção de cálcio intracelular e liberação de glutamato. Além das habilidades técnicas, pude desenvolver um grande amadurecimento científico, sempre guiada pela minha orientadora Profa. Dra. Fabíola M. Ribeiro, que durante a execução deste projeto estabeleceu uma relação de muito profissionalismo e compromisso com a minha formação. Além do mencionado, desenvolvemos trabalhos de grande relevância para o programa de Neurociências, tanto artigos científicos originais quanto trabalhos de revisão crítica da literatura. Cabe ressaltar que durante os 4 anos do doutoramento presenciei o laboratório de Neurobioquímica, ao qual faço parte, desenvolver-se a passos largos fisicamente e intelectualmente. Nosso grupo cresceu neste período e, todos que dele fazem e fizeram parte auxiliaram de alguma forma para este trabalho, seja intelectualmente ou colaborando diretamente com experimentos e experiências.

LISTA DE ABREVIACÕES

ADE	Aumento dependente de anticorpos – do inglês “ <i>antibody-dependent enhancement</i> ”
Akt	Proteína quinase do tipo B
AMPA	α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AXL	Receptor tirosino-quinase do tipo AXL
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
Ca ²⁺	Íons cálcio
CaMKIV	Proteína quinase Cálcio/Calmodulina do tipo IV
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP
DENV	Dengue vírus
DNA	Ácido desoxiribonucleico
E15	Embriões com 15 dias de gestação
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
Fc	Receptor do tipo Fc
FOXO	Fatores de transcrição do tipo <i>Forkhead</i>
Fura-2AM	Éster Fura-2-acetoxi metílico
GBS	Síndrome de <i>Guillain-Barré</i>
GLS	Glutaminase
GluN1	Subunidade 1 do receptor N-metil D-aspartato
GluN2A	Subunidade 2A do receptor N-metil D-aspartato
GluN2B	Subunidade 2B do receptor N-metil D-aspartato
HBSS	Tampão salino balanceado – do inglês “ <i>Hank’s Balanced Salt Solution</i> ”
IFN α / β R ^{-/-}	Camundongos deficientes em receptores de interferon tipo I
IL-1RA	Antagonista do receptor de IL-1 – do inglês “ <i>interleukin-1 receptor antagonist</i> ”
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
JEV	Vírus da encefalite japonesa – do inglês “ <i>Japanese encephalitis virus</i> ”
Mertk	Receptor tirosino-quinase do tipo Mertk

Mg ²⁺	Íon Magnésio
MK-801	Dizocilpina
MOCK	Grupo controle não infectado com o ZIKV
mRNA	RNA mensageiro
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NMDA	N-metil D-aspartato
NMDAR	Receptor de N-metil-d-Aspartato
NPCs	Células neurais progenitoras humanas
p-CREB	Proteína CREB fosforilada
p-ERK	Proteína ERK fosforilada
PBS	Tampão fosfato-salino
PI3K	Fosfoinositol-3-quinase
PP-1	Proteína fosfatase do tipo PP-1 – do inglês “ <i>protein phosphatase 1 catalytic subunit</i> ”
RNA	Ácido ribonucleico – do inglês “ <i>ribonucleic acid</i> ”
RNAi	RNA de interferência
RT-qPCR	Reação de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo
SLC1a	Transportador de glutamato
SNC	Sistema nervoso central
TBEV	Encefalite transmitida por carrapato – do inglês “ <i>Tick-borne encephalitis virus</i> ”
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
Tyro3	Receptor tirosino-quinase do tipo Tyro3
WNV	Vírus do oeste do Nilo – do inglês “ <i>West Nile virus</i> ”
ZIKV	Vírus da Zika

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos temporoespaciais atribuídos à disseminação do ZIKV.....	17
Figura 2. Estrutura molecular do ZIKV e sua replicação em neurônios.....	19
Figura 3. Organização molecular dos NMDARs.....	25
Figura 4. Efeitos opostos gerados pela sinalização dos NMDARs sináptico e extrasináptico frente a excitotoxicidade.....	28
Figura 5. Culturas primárias de células córtico-estriatais são compostas predominantemente por neurônios.....	44
Figura 6. Níveis de RNA do ZIKV em cultura primária de neurônios e de células da glia.....	45
Figura 7. O ZIKV promove neurodegeneração em culturas primárias de neurônios.....	47
Figura 8. O ZIKV induz a apoptose celular através de um mecanismo não-autônomo.....	49
Figura 9. A infecção pelo ZIKV induz níveis aumentados de glutamato extracelular e aumento do fluxo de Ca^{2+} intracelular através da subunidade GluN2B.....	51
Figura 10. O bloqueio do NMDAR previne a morte neuronal induzida pelo ZIKV em cultura primária de neurônios.....	53
Figura 11. A inibição de GluR2B bloqueia a neurotoxicidade induzida pelo ZIKV.....	54
Figura 12. A infecção pelo ZIKV aumenta a expressão de GluN2.....	56
Figura 13. O tratamento com Ifenprodil em culturas infectadas pelo vírus Zika (ZIKV) leva ao aumento da fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK).....	58
Figura 14. O tratamento com Ifenprodil leva ao aumento da fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB).....	59
Figura 15. A infecção pelo ZIKV induz a expressão do fator de necrose tumoral α (TNF- α).	60
Figura 16. A infecção pelo ZIKV induz a transcrição da interleucina-1 β (IL-1 β)......	61
Figura 17. Citocinas pró-inflamatórias induzem a morte neuronal por um mecanismo induzido pela infecção do ZIKV.....	62
Figura 18. Níveis de expressão da glutaminase e transportador de glutamato após a infecção por ZIKV.....	63
Figura 19. Citocinas pró-inflamatórias facilitam a excitotoxicidade decorrente da infecção pelo ZIKV.....	64
Figura 20. Efeito dos fatores extracelulares produzidos pelos neurônios infectados com o ZIKV em cultura primária mista de glia.....	65
Figura 21. O ZIKV promove a morte de células neuronais de maneira não autônoma.....	71
Figura 22. O ZIKV desencadeia a liberação de fatores neurotóxicos promovendo a neurodegeneração via ativação de NMDAR contendo a subunidade GluN2B.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vírus da família <i>Flaviviridae</i> envolvidos em distúrbios neurológicos em humanos.	19
Tabela 2. Volumes (em μL) dos reagentes utilizados para a extração de RNA total.	39
Tabela 3. Iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR.	41

RESUMO

Em 2015, o Brasil foi acometido por uma epidemia causada pelo vírus da Zika (ZIKV), um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*. Para a maioria dos indivíduos, a infecção pelo ZIKV apresenta-se assintomática e, nos quadros sintomáticos, os sinais clínicos são geralmente brandos incluindo febre, artralgias e *rash* cutâneo. Entretanto, o ZIKV pode desencadear complicações neurológicas graves, comprometendo o desenvolvimento de fetos de mães infectadas. Nestes casos, o vírus apresenta neurotropismo, desencadeando neuroinflamação, morte de neurônios e morte de células precursoras neuronais, levando ao desenvolvimento de microcefalia. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre os eventos que desencadeiam a neurodegeneração promovida pela infecção pelo ZIKV. Neste trabalho, nós utilizamos infecções em cultura de neurônios primários de camundongos C57/BL6 a fim de caracterizar a morte neuronal mediada pelo vírus. Nossos resultados mostram que neurônios primários infectados pelo ZIKV são induzidos à morte neuronal por apoptose através de um mecanismo não autônomo. Em culturas neuronais infectadas com ZIKV há aumento significativo da ativação de caspase 3 em neurônios não infectados adjacentes a neurônios infectados, devido possivelmente ao aumento dos níveis de glutamato extracelular, aumento da expressão do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e aumento da expressão de interleucina-1 β (IL-1 β) nestas culturas. Além disto, observamos o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular nas culturas neuronais infectadas pelo ZIKV, o que poderia facilitar a excitotoxicidade observada. Em termos moleculares, foi observado que a infecção pelo ZIKV promove o aumento significativo da expressão da subunidade 2B do receptor N-metil D-aspartato (GluN2B). O bloqueio da atividade das citocinas nas culturas neuronais infectadas acarreta uma diminuição dos níveis de Ca^{2+} intracelulares e, assim, diminuem a neurodegeneração. Este evento sugere a possível interação do TNF- α e IL-1 β com os receptores de *N*-Methyl-D-Aspartate (NMDAR). Ademais, a inibição do NMDAR contendo GluN2B aumenta a taxa de sobrevivência das células

infectadas pelo ZIKV e promove a ativação de vias biológicas neuroprotetoras, tais como da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP (CREB). Portanto, nossos resultados sugerem que a excitotoxicidade gerada após a infecção pelo ZIKV é mediada pelo mecanismo clássico de elevação dos níveis de glutamato extracelular, como também pelas citocinas pró-inflamatórias liberadas pelo próprio neurônio infectado. Além do mais, o aumento da viabilidade celular promovida pelo bloqueio de NMDAR, após a infecção pelo vírus, pode ser uma boa estratégia terapêutica para prevenir a morte neuronal mediada pelo ZIKV.

Palavras-chaves: Zika Vírus, Receptores de *N*-Methyl-D-Aspartate (NMDA), GluN2B, Fator de Necrose tumoral- α , Interleucina-1 β

ABSTRACT

In 2015, Brazil was affected by an outbreak caused by zika virus (ZIKV), which is an arbovirus from the *Flaviviridae* family. For most individuals, ZIKV infection is asymptomatic and in most symptomatic cases clinical signs are usually mild, including fever, arthralgia, and skin rash. However, ZIKV can trigger serious neurological complications, causing microcephaly among fetuses of infected pregnant women. It has been demonstrated that the virus is neurotropic, triggering neuroinflammation and the death of neurons and neuronal precursor cells, promoting microcephaly. However, little is known about the mechanism involved in the neurodegeneration triggered by ZIKV infection. Here, we performed viral infection in cultures of C57/BL6 embryos primary neurons to characterize the ZIKV-mediated neuronal death. Our data show that ZIKV infection in primary neurons triggered apoptosis-mediated neuronal death under a non-autonomous mechanism. Virus-infected neuronal cultures exhibited a significant increase in caspase 3 activation in uninfected neuronal cells that were nearby infected cells, due to increased levels of extracellular glutamate, increased expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and increased expression of interleukin-1 β (IL-1 β) in these cultures. Moreover, we observed increased levels of intracellular Ca²⁺ on ZIKV-infected neuronal cultures, which correlates with the excitotoxicity observed. At the molecular level, we observed that ZIKV infection promoted significant increase in the expression levels of N-methyl D-aspartate receptor 2-subunit (GluN2B). The activity blockade of TNF- α and IL-1 β on these neurons led to decreased intracellular Ca²⁺ levels, thus preventing ZIKV-mediated neurodegeneration. These results suggest that cytokines and N-Methyl-D-Aspartate (NMDAR) receptors may interact. Furthermore, the blockade of NMDAR containing GluN2B increases the survival rates of ZIKV-infected cells and promotes the activation of neuroprotective biological pathways, such as the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and cAMP-responsive element binding protein (CREB). Altogether, these results suggest that the

excitotoxicity observed following ZIKV infection is mediated by the classical mechanism involving elevated levels of extracellular glutamate and increased release of proinflammatory cytokines by infected neuronal cultures. Besides, the increase in cell viability promoted by NMDAR blockade after virus infection appears to be a good therapeutic strategy to prevent neuronal death mediated by ZIKV.

Keywords: Zika Virus, *N*-Methyl-D-Aspartate Receptors (NMDA), GluN2B, Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β

RELEVANCIA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A recente epidemia de infecção pelo Zika vírus (ZIKV) observada em diversas regiões do mundo, com intensa presença e agressividade nas Américas, mostrou-se alarmante e gerou consequências socioeconômicas graves para os países afetados. Publicações científicas recentes evidenciaram o impacto provocado pelo surto epidêmico do ZIKV, o que gerou um esforço de órgãos governamentais do Brasil e do mundo em busca de causas e tratamento. Sendo o ZIKV um agente etiológico que possui neurotropismo, neste trabalho nós utilizamos como ferramentas modelos experimentais *in vitro* que mimetizam consideravelmente os fenótipos encontrados nos casos clínicos. Através de testes preliminares, realizados com bloqueadores dos NMDARs, obtivemos uma redução considerável da morte celular induzida pelo ZIKV, o que lançou a possibilidade do uso destes fármacos como forma de tratamento.

Dentro desta proposta, publicamos dois estudos complementares que investigaram os efeitos neuroprotetores de fármacos, moduladores do sistema glutamatérgico, em insultos promovidos pelo ZIKV. No primeiro estudo, realizado em colaboração com o prof. Dr. Mauro M. Teixeira, investigamos o uso do bloqueador de NMDAR, Memantina, como um agente neuroprotetor frente ao insulto de ZIKV (Costa, Del Sarto et al. 2017). Já no segundo estudo, descrito nesta tese, investigamos os mecanismos biológicos envolvidos nesta neuroproteção (Olmo, Carvalho et al. 2017). Sendo as drogas testadas já amplamente utilizadas pela clínica médica, nossos estudos poderão facilitar ensaios clínicos futuros por se tratar de medicamentos padronizados em termos de segurança, tolerabilidade e efeitos adversos. Embora os resultados pré-clínicos não garantam os efeitos em humanos, o tratamento com bloqueadores dos NMDARs para retardar a perda de tecido nervoso promovido pelo ZIKV é promissor. Os resultados obtidos lançam esperança de tratamento, não somente em pacientes infectados pelo ZIKV, mas também no caso de infecção por outros arbovirus

1. INTRODUÇÃO

1.1 ZIKV: aspectos epidemiológicos

O ZIKV é transmitido por mosquitos vetores do gênero *Aedes*. Foi isolado pela primeira vez de macacos encontrados na floresta Ziika, na Uganda, em 1947 (Dick, Kitchen et al. 1952). Na segunda metade do século 20, poucos casos de humanos infectados com o vírus foram relatados. Em sua maioria, os casos circundavam os países africanos, com a exceção de um estudo asiático que confirma a presença do ZIKV em “pools” de mosquitos *Aedes aegypt* na Malásia, em 1966 (Marchette, Garcia et al. 1969). Em 2007, entretanto, foi relatado o primeiro surto de ZIKV fora dos continentes africano e asiático, nas ilhas Yap, na Micronésia (Duffy, Chen et al. 2009). Surtos adicionais de infecção pelo ZIKV ocorreram em países banhados pelo oceano Pacífico, incluindo a Polinésia Francesa em 2013 (Cao-Lormeau, Roche et al. 2014), as Ilhas Cook e a Nova Caledônia em 2014 (Roth, Mercier et al. 2014). Ainda no ano de 2014, foi publicado o primeiro registro de um paciente apresentando déficits neurológicos característicos da síndrome de *Guillain-Barré* (GBS) após uma infecção pelo ZIKV (Figura 1A) (Oehler, Watrin et al. 2014). Casos de GBS subsequentes foram identificados na Polinésia Francesa e correlacionados retrospectivamente com o surto de ZIKV (Cao-Lormeau, Blake et al. 2016) (Figura 1A). A primeira evidência de circulação do ZIKV nas Américas foi detectada em uma ilha chilena do Pacífico, entre fevereiro e junho de 2014 (Organização Pan-americana de Saúde / Organização Mundial da Saúde, 2016). No entanto, somente foram observados outros surtos epidêmicos pela América Latina e Caribe após a introdução do ZIKV no Brasil (Musso 2015, Faria, Azevedo et al. 2016). Em meados de janeiro de 2016, a circulação do ZIKV já havia sido detectada em 18 países e em outros territórios nas Américas (Figura 1B) (dados do Centro Europeu para o Controle e Prevenção de Doenças - ECDC, 2015).

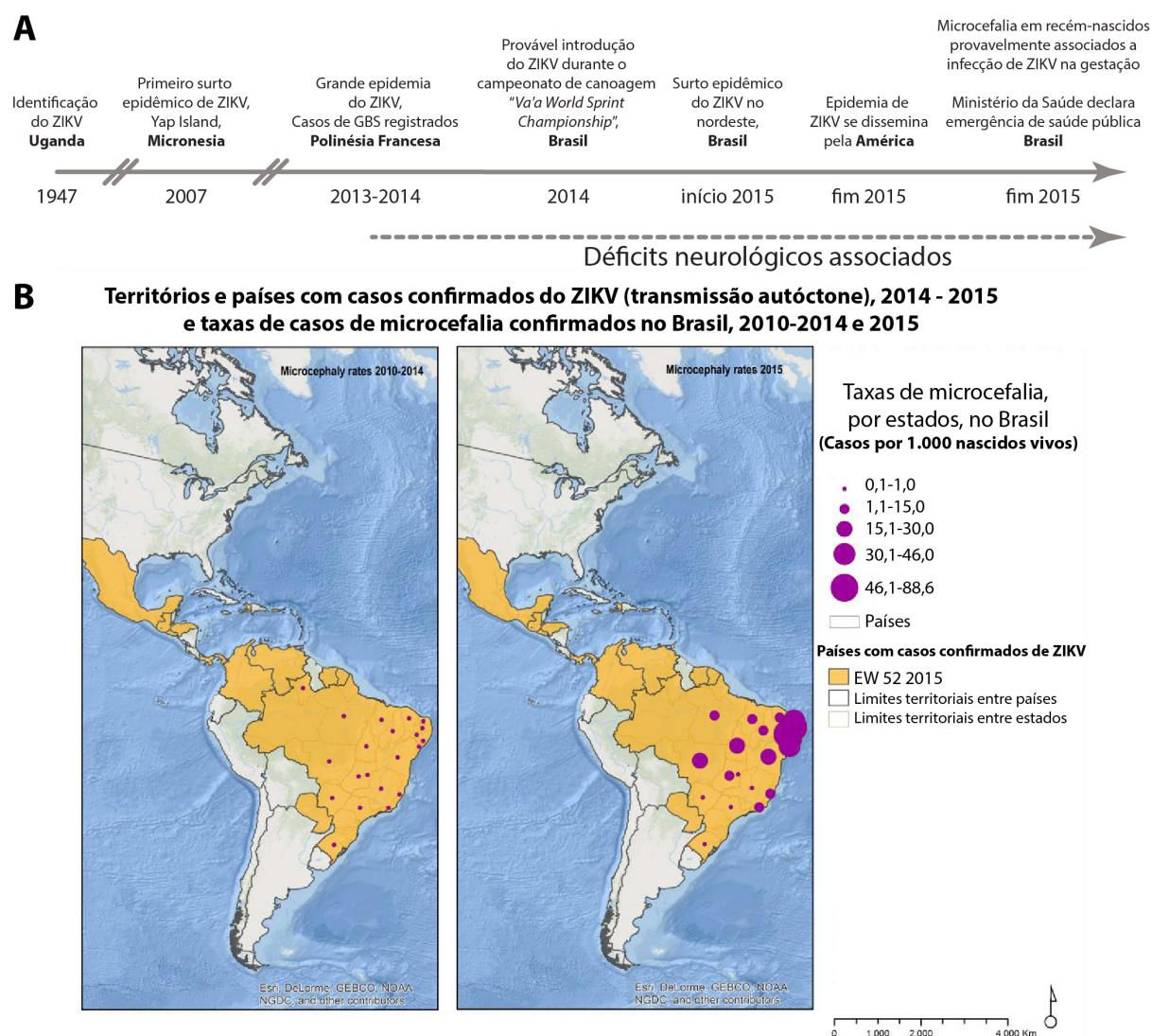


Figura 1. Aspectos temporoespaciais atribuídos à disseminação do ZIKV. (A) Cronograma epidemiológico da disseminação global do Zika vírus (ZIKV). Adaptado de (Musso 2015, Ribeiro and Kitron 2016, Krauer, Riesen et al. 2017). **(B)** Distribuição geográfica dos casos de microcefalia confirmados nos anos de 2010-2014 (painel da esquerda) e do ano de 2015 (painel da direita). Adaptado de European Centre for Disease Prevention and Control, 2015.

A disseminação do ZIKV foi acompanhada por um aumento do número de casos clínicos apresentando maior complexidade. Na maioria dos casos, os pacientes são assintomáticos e, nos casos sintomáticos, os sinais clínicos são tipicamente leves e duram em torno de 2 a 7 dias. Comumente os indivíduos infectados pelo ZIKV podem apresentar um quadro de febre, dor nas articulações, dor de cabeça e erupções maculopapular. Porém, a partir de 2013, foram notificados os primeiros casos com histórico de hospitalização e síndromes neurológicas associados ao vírus (Figura 1A). No continente americano, outras síndromes

neurológicas como meningite, meningoencefalite e mielite, também foram associadas à infecção pelo ZIKV. Sendo que, em outubro de 2015, o governo brasileiro declarou emergência de saúde pública devido ao aumento drástico de crianças nascidas com microcefalia no estado de Pernambuco (Figura 1B). Três estados do Nordeste responderam pela maioria dos casos suspeitos de microcefalia notificados (Pernambuco: 1.306 casos; Paraíba: 665 casos; e Bahia: 496 casos) (Figura 1B). Entre 512 casos de infecção pelo vírus investigados mais profundamente, o diagnóstico de microcefalia foi confirmado em 230 (Centro Europeu para o Controle e Prevenção de Doenças - ECDC, 2015).

1.2 ZIKV: Características gerais e neurotropismo associados ao ZIKV

O ZIKV é um vírus envelopado, com o conteúdo genético constituído por uma fita simples de RNA senso positivo. Pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, que também inclui vários patógenos humanos como o vírus da febre-amarela (YFV – *Yellow Fever virus*), Dengue vírus (DENV), vírus da Encefalite Japonesa (JEV – *Japanese encephalitis virus*), vírus da Encefalite de carrapatos (TBEV – *Tick-borne encephalitis virus*), e o vírus do Oeste do Nilo – (WNV – *West Nile virus*). O genoma do ZIKV é constituído por três partes: duas extremidades não codificantes que flanqueiam a janela de leitura, que é codificadora. Esta última dá origem a uma poliproteína que é clivada em dez partes, dando origem então à proteína do capsídeo, às proteínas do precursor de membrana e do envelope, bem como a sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 2A) (Wang, Thurmond et al. 2017).

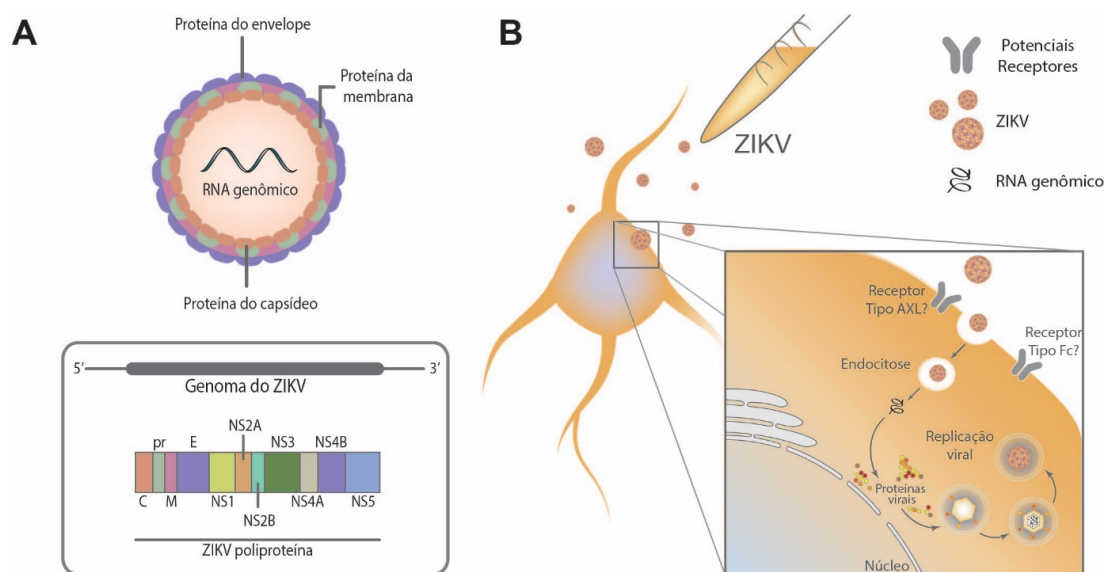


Figura 2. Estrutura molecular do ZIKV e sua replicação em neurônios. (A) O genoma viral consiste de uma fita positiva de RNA, contendo 10.617 nucleotídeos. A estrutura do ZIKV consiste em duas extremidades não codificadoras, e uma região codificadora para a poliproteína que dá origem aos componentes estruturais do vírus (proteínas do envelope (E), membrana (M) e capsídeo (C)), além de sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). (B) Alguns estudos propõem que o ciclo de replicação do ZIKV, em neurônios, pode ser iniciado pela ligação do vírus aos receptores tirosino-quinase do tipo AXL e Tyro3, ou ao receptor tipo Fc, da célula hospedeira. Em seguida, o vírus é internalizado mediante a endocitose e o RNA viral é descoberto do seu revestimento proteico. O genoma é traduzido em um grande poliproteína que sofre um processamento para produzir proteínas maduras, estruturais e não-estruturais. As proteínas maduras participam da transcrição e replicação do RNA viral, bem como da montagem e liberação do vírus. Adaptado de (Li, Saucedo-Cuevas et al. 2016).

Tabela 1. Vírus da família *Flaviviridae* envolvidos em distúrbios neurológicos em humanos.

Vírus	Sinais clínicos neurológicos	Referência(s)
ZIKV	Fetal Microcefalia Transtornos Cognitivos Cegueira	(Li, Saucedo-Cuevas et al. 2016)
	Adulto Conjuntivite Uveíte Poliradiculopatias (GBS)	
DENV	Encefalopatia (falência hepática e distúrbios metabólicos) Encefalite Complicações neuromusculares (GBS, disfunções musculares transientes) Meningite /Meningoencefalite	(Carod-Artal, Wichmann et al. 2013) (Araujo, Nogueira et al. 2012)
WNV	Paralisia flácida aguda Meningite Encefalite	(Li, Loeb et al. 2003) (Petersen and Marfin 2002)
JEV	Convulsões Paralisia flácida aguda Sintomas extrapiramidais Déficits neurológicos focais	(Ludlow, Kortekaas et al. 2016)
TBEV	Meningite /Meningoencefalite Distúrbios cognitivos Distúrbios comportamentais/psiquiátricos Perda auditiva Distúrbios da visão Distúrbios do equilíbrio e coordenação motora Paralisia flácida	(Ludlow, Kortekaas et al. 2016) (Li, Saucedo-Cuevas et al. 2016)

Diversas espécies de vírus originados da família *Flaviviridae* são neurotrópicos e estão associados a doenças neurológicas acometidas em humanos (Tabela 1). Dentre os comprometimentos neurológicos resultantes de infecções virais, a GBS é um distúrbio pós-infeccioso, que induz uma resposta autoimune direcionada aos nervos periféricos e suas raízes, gerando um espectro fenotípico caracterizado pela polineuropatia desmielinizante ou neuropatia axonal aguda (Willison, Jacobs et al. 2016). Em infecções por ZIKV, por exemplo, estudos recentes apontam que a GBS apresenta características eletrofisiológicas compatíveis com o tipo de neuropatia axonal motora aguda, resultando, em termos clínicos, em uma fraqueza muscular generalizada, com disfunção de marcha e sinais de paralisia facial (Cao-Lormeau, Blake et al. 2016). Em termos morfológicos, a GBS caracteriza-se tipicamente por uma desmielinização ou dano axonal de nervos periféricos que não necessariamente é associada à morte da célula neuronal. Entretanto, outras manifestações clínicas resultantes de infecções pelo ZIKV podem desencadear a morte de células neuronais. Estudos de caso apontaram que amostras cerebrais de fetos originados de mães infectadas pelo ZIKV apresentaram calcificações difusas e atrofia nas regiões da substância branca e cinzenta do córtex cerebral, assim como nos núcleos da base e no tálamo (Mlakar, Korva et al. 2016, Schwartz 2017). A identificação do ZIKV nestas amostras forneceu evidências de que o vírus é capaz de romper a barreira placentária para infectar células neurais ainda em desenvolvimento (Mlakar, Korva et al. 2016). Em concordância, em outro estudo foi detectado ZIKV na placenta e no líquido amniótico de mulheres grávidas cujos fetos foram diagnosticados com microcefalia, confirmando então que o ZIKV pode atravessar a barreira placentária (Calvet, Aguiar et al. 2016, Martines, Bhatnagar et al. 2016, Sarno, Sacramento et al. 2016). A microcefalia é um sinal clínico diagnosticado quando a circunferência occipitofrontal apresenta mais de dois desvios-padrão abaixo da média para idade gestacional e sexo (Woods 2004, Devakumar, Bamford et al. 2018). Trata-se de uma condição clínica

associada ao desenvolvimento incompleto do SNC, que pode desencadear alterações na capacidade intelectual, atraso no desenvolvimento motor, epilepsia, bem como distúrbios oftalmológicos e audiológicos (Devakumar, Bamford et al. 2018). A microcefalia pode ser dividida em dois tipos: primária, que se desenvolve durante o período gestacional, e secundária, que se desenvolve após o nascimento do indivíduo (Devakumar, Bamford et al. 2018). A microcefalia primária geralmente é causada por alterações da neurogênese ou pela morte de células progenitoras neuronais (NPCs) (Woods 2004). Evidências experimentais mostraram que a regulação dos números e subtipos de NPCs é essencial para controlar o tamanho e a morfologia do cérebro. Por exemplo, uma redução significativa no número destas células devido à morte celular, a parada do ciclo celular ou a diferenciação neuronal prematura, pode reduzir o tamanho do cérebro em desenvolvimento e desenvolver o quadro de microcefalia (Buchman, Tseng et al. 2010, Lancaster, Renner et al. 2013, Dang, Tiwari et al. 2016, Mlakar, Korva et al. 2016). Dentro desta perspectiva, estudos recentes apontam para a vulnerabilidade de células progenitoras a infecções pelo ZIKV e a correlação com o desenvolvimento da microcefalia. A infecção pelo ZIKV em NPCs derivados de células-tronco pluripotentes induzidas forneceu a primeira evidência de que os neurônios humanos são suscetíveis à infecção por ZIKV. Além disto, os NPCs infectados pelo ZIKV apresentaram aumento significativo da morte celular e análises moleculares demonstraram uma desregulação das vias biológicas envolvidas na progressão do ciclo celular, justificando o crescimento atenuado dos NPCs (Tang, Hammack et al. 2016). Modelos *in vitro* recentes que simulam o desenvolvimento do cérebro, denominados neuroesferas ou organoides cerebrais, revelaram que a infecção por ZIKV também é capaz de comprometer a viabilidade neuronal, além de reduzir a proliferação celular, comprometendo o volume dos organoides (Garcez, Loiola et al. 2016).

Embora os estudos anteriores caracterizam a microcefalia mediada pela infecção viral, estudos recentes revelaram que a síndrome congênita desencadeada pelo ZIKV pode extrapolar

o fenótipo da microcefalia (van der Linden, Pessoa et al. 2016). Diante disto, outro sistema também afetado pela infecção do ZIKV é a visão. Algumas regiões dos olhos parecem ser tão vulneráveis a infecção quanto o encéfalo. Em um estudo com recém-nascidos portadores de microcefalia e infecção prévia de ZIKV, foram identificados defeitos oculares em mais de um terço dos casos, atrofia corio-retiniana e disfunções do nervo óptico. Outros estudos também identificaram disfunções na retina e nervo óptico em condições amostrais semelhantes (de Paula Freitas, de Oliveira Dias et al. 2016, Martines, Bhatnagar et al. 2016, Ventura, Maia et al. 2016). Em linhas gerais, estes estudos confirmam o tropismo particular do ZIKV para as células neurais.

1.3 ZIKV: Vulnerabilidade das células neuronais

A infecção pelo ZIKV se inicia com a ligação do vírus aos receptores na superfície de células susceptíveis, levando à endocitose da partícula viral mediada por receptor (Figura 2B). Acredita-se que parte da susceptibilidade dos neurônios à infecção pelo vírus deve-se à composição das moléculas de superfície presente nestas células. Assim, diversos receptores envolvidos na endocitose da partícula viral foram identificados, incluindo a família de receptores tirosino-quinase (Tyro3, AXL e Mertk), imunoglobulinas de células T (TIM), receptores de lecitina tipo C e receptores de fosfatidilserina (Perera-Lecoin, Meertens et al. 2013). Dentre eles, os candidatos AXL e Tyro3 tem sido os mais debatidos, baseado em seu papel na mediação da entrada do DENV e no envolvimento destes receptores em mecanismos de diferenciação neuronal, como mostrado na Figura 2B (Meertens, Carnec et al. 2012, Hastings, Yockey et al. 2017) (Figura 2B). De fato, o bloqueio tanto de AXL quanto de Tyro3, por anticorpos neutralizantes ou pelo silenciamento mediado por RNAi, inibe a entrada do ZIKV em fibroblastos humanos quando comparado as células controle infectadas (Hamel, Dejarnac et al. 2015). Além disto, durante o desenvolvimento do cérebro humano, células do

tipo astrócitos, micróglias e radial-gliais apresentam alto nível de expressão do AXL, reforçando a possibilidade de que esse receptor tenha um papel importante na entrada do ZIKV na célula (Hamel, Dejarnac et al. 2015). Entretanto, estudos recentes observaram que camundongos knockout para AXL ou Tyro3, bem como camundongos deficientes duplamente para AXL e Mertk, infectados com o ZIKV, exibem níveis semelhantes de vírus em comparação aos camundongos selvagem infectados, sugerindo que estes não são os únicos receptores que podem ser utilizados para a infecção pelo ZIKV (Hamel, Dejarnac et al. 2015, Hastings, Yockey et al. 2017).

Um amplo debate tem sido realizado quanto ao fenômeno denominado intensificação dependente de anticorpos (ADE – do inglês “*antibody-dependent enhancement*”) e o seu envolvimento nos sintomas neurológicos decorrentes da infecção pelo ZIKV (Guzman and Vazquez 2010). Em linhas gerais, o fenômeno ocorre quando os anticorpos induzidos após uma infecção pelo DENV aumentam a infectividade de uma segunda exposição ao vírus. Desta forma, os anticorpos produzidos na primeira infecção ligam-se ao novo vírus e este imuno-complexo formado será reconhecido por receptores do tipo Fc, na superfície da célula hospedeira, para ser endocitado (Figura 2B). As consequências são o aumento da gravidade dos sinais e sintomas, acompanhado de aumento da taxa de replicação viral. Nesta perspectiva, ensaios realizados *in vitro* revelaram que soro contendo anticorpos reativos ao DENV reagem de maneira cruzada ao ZIKV, não o neutralizam e ainda aumentam os níveis de replicação da segunda infecção viral inclusive em tecido nervoso (Dejnirattisai, Supasa et al. 2016, Paul, Carlin et al. 2016, Hastings, Yockey et al. 2017). Entretanto, estes resultados não foram reproduzidos quando se utilizou modelos de primatas não humanos, demonstrando que possivelmente outras variáveis podem interferir na reprodutibilidade do fenômeno (McCracken, Gromowski et al. 2017, Pantoja, Perez-Guzman et al. 2017). Embora haja o

reconhecimento da gravidade clínica decorrente do neurotropismo do ZIKV, o mecanismo biológico que torna o organismo e os neurônios suscetíveis a este vírus ainda está em debate.

1.4 Receptores de NMDA: Aspectos gerais e vias biológicas

O sistema nervoso central (SNC) de mamíferos tem o glutamato como o principal neurotransmissor excitatório. Fisiologicamente, o glutamato apresenta funções importantes no desenvolvimento do neurônio, na plasticidade sináptica e memória (Lipton and Rosenberg 1994, Zhou and Danbolt 2014). Os receptores de glutamato são classificados em 2 tipos: ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores do tipo ionotrópicos incluem receptores de N-metil-D-Aspartato (NMDAR), α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e cainato. Os receptores ionotrópicos são canais iônicos, dependentes de voltagem e levam ao influxo dos íons cálcio (Ca^{2+}) e/ou sódio, além do efluxo de potássio. Já os receptores do tipo metabotrópicos são acoplados à proteína G e a sua atividade leva a sinalização via segundos mensageiros, por exemplo, alterando os níveis de cAMP ou modulando a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (Benarroch 2011).

Os NMDAR são estruturas heteroméricas compostas por quatro subunidades derivadas de três famílias: GluN1, GluN2 (isoformas A-D) e GluN3 (isoformas A-B). Os NMDARs são formados por duas subunidades obrigatórias de GluN1, contendo o sítio de ligação para a glicina, uma ou duas subunidades GluN2, que se ligam ao glutamato, e/ou uma ou duas subunidades de GluN3 que se ligam também à glicina (Figura 3A). Os níveis de expressão, bem como a composição das subunidades dos NMDARs são dinâmicos e mudam sua constituição nos neurônios ao longo do desenvolvimento e em resposta à atividade neuronal (Martel, Wyllie et al. 2009, Hardingham and Bading 2010). Por exemplo, os NMDARs contendo GluN1/GluN2A são mais expressos no SNC adulto, enquanto aqueles contendo as subunidades GluN1/GluN2B, predominam durante o desenvolvimento e tendem a se

concentrar em sítios extra-sinápticos (Martel, Wyllie et al. 2009, Hardingham and Bading 2010, Martel, Ryan et al. 2012). Os NMDARs são canais catiônicos, permeáveis ao Ca^{2+} (Figura 3B). No potencial de repouso de membrana, o poro é bloqueado pelo íon magnésio (Mg^{2+}). Após a ativação do receptor pelo ligante, o Mg^{2+} é removido resultando no influxo de íons e consequente despolarização pós-sináptica (Figura 3B). (Nowak, Bregestovski et al. 1984, Mori, Masaki et al. 1992).

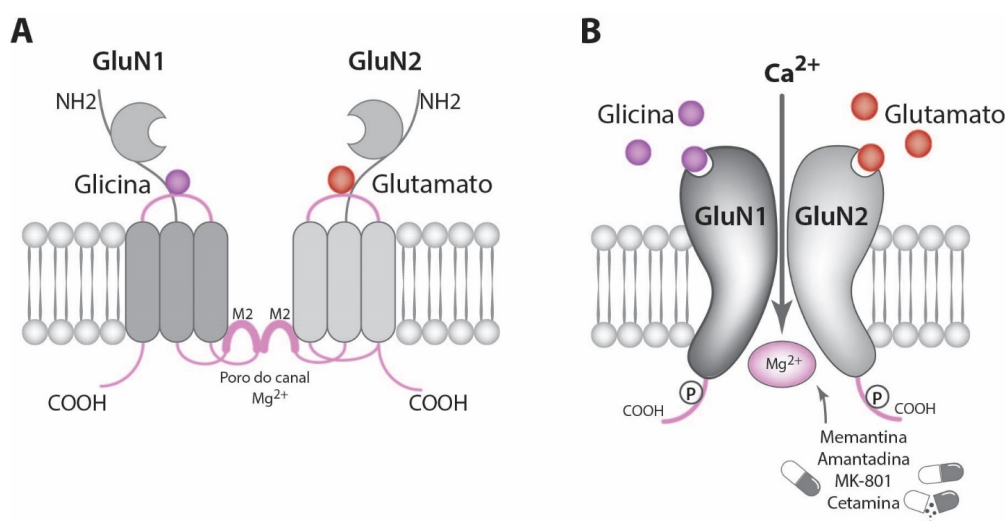


Figura 3. Organização molecular dos NMDARs. (A) Os NMDARs são complexos tetraheteroméricos compostos pelas subunidades: GluN1, subunidade obrigatória que interage com as subunidades GluN2 ou GluN3 para formar um receptor funcional. Classicamente, o NMDAR requer 2 subunidades GluN1, que se ligam a glicina (hexágono roxo), e 2 subunidades GluN2 que ligam o glutamato (círculo vermelho). Cada subunidade de NMDAR contém um domínio amino terminal extracelular (NH₂), 3 domínios que transpassam a membrana (M1, M3, M4), uma alça revestindo o poro (M2) e um domínio intracelular carboxi-terminal sujeitos a fosforilação (COOH). (B) O conjunto funcional, contendo 4 subunidades, formam uma cavidade contendo os locais de ligação do glutamato ou da glicina. Os NMDARs são permeáveis a Ca^{2+} e sua ativação requer 2 moléculas de glutamato e 2 moléculas de glicina. A região do poro contém resíduos de asparagina (N) que determinam a seletividade do íon Ca^{2+} . A abertura do poro é voltagem dependente, e o seu fechamento se dá pelo íon Mg^{2+} . Adaptado de (Benarroch 2011).

Os NMDARs distribuem-se amplamente nos neurônios induzindo respostas intracelulares diferentes dependendo da sua localização (Hardingham and Bading 2010). Os NMDARs localizados na região sináptica são constituídos, em sua maioria, pelas subunidades GluN1/GluN2A (Steigerwald, Schulz et al. 2000, Groc, Heine et al. 2006, Hardingham and Bading 2010). Estudos recentes apontam que as vias de sinalização celular mediadas pelos NMDARs, localizados nos sítios sinápticos, parecem estar envolvidas na sobrevivência e supressão da morte celular, bem como no neurotrofismo (Lonze, Riccio et al. 2002, Vanhoutte

and Bading 2003, Liu, Wong et al. 2007, Paoletti, Bellone et al. 2013). Com a ativação do receptor, parte do influxo de Ca^{2+} intracelular direciona-se para o núcleo da célula promovendo a ativação da proteína quinase dependente de Ca^{2+} /Calmodulina do tipo IV (CaMKIV) e a fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP (CREB) (Figura 4A) (Enslin, Sun et al. 1994, Matthews, Guthrie et al. 1994, Hardingham, Arnold et al. 2001, Lemrow, Anderson et al. 2004). Embora o CREB seja um mediador importante na neuroproteção, outros fatores de transcrição também podem ser parcialmente controlados pelo Ca^{2+} nuclear, como o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) (Vashishta, Habas et al. 2009). Além disto, o NMDAR interage com fatores dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (RasGRF1) que compõem a via da proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2), envolvida na plasticidade sináptica (Krapivinsky, Krapivinsky et al. 2003). A sinalização de NMDAR também pode induzir a ativação de fatores de transcrição, tais como o fator nuclear I subtipo A (NFIA), por uma via dependente de ERK1/2, resultando em uma atividade neuroprotetora (Zheng, Eacker et al. 2010) (Figura 4A). Em conjunto, a atividade fisiológica dos NMDARs evoca a transcrição de genes relacionados à plasticidade e manutenção da homeostase neuronal.

1.5 Receptores de NMDA: Excitotoxicidade

Em um contexto patológico, como por exemplo em um quadro isquêmico, hemorrágico ou um trauma do SNC, os neurônios alvo da injúria ficam privados da energia necessária para manter a homeostase iônica. Este fenômeno pode desencadear o acúmulo intracelular de cátions com consequente despolarização, inchaço osmótico, lise e morte neuronal (Lipton and Rosenberg 1994). Os neurônios sujeitos a este estresse celular, liberam uma quantidade excessiva do neurotransmissor glutamato, o que facilita a ativação de NMDAR presentes nas regiões extra-sinápticas. Desta forma, os receptores de glutamato tornam-se superativados permitindo que altos níveis de Ca^{2+} entrem na célula (Figura 4B). O influxo aumentado de Ca^{2+}

ativa enzimas do tipo fosfolipases, endonucleases e proteases que podem danificar membranas, componentes do citoesqueleto e o DNA (Lipton and Nicotera 1998). Em paralelo, as mitocôndrias podem sofrer colapso na medida que não conseguem tamponar todo o Ca^{2+} sobressalente no citosol, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio e ativação de caspases (Lipton and Nicotera 1998). Os neurônios, energeticamente comprometidos pela disfunção mitocondrial, tornam-se despolarizados (carregados positivamente) e não conseguem reestabelecer a homeostase iônica. Como consequência, a despolarização constante diminui o bloqueio do canal pelo Mg^{2+} , aumentando ainda mais o influxo de Ca^{2+} intracelular (Zeevalk and Nicklas 1992, Kushnareva, Wiley et al. 2005). Diversos transcritos de mRNA também podem sofrer alterações em condições de excitotoxicidade. Nestes casos, fatores de transcrição do tipo *Forkhead* (FOXO) são translocados para o núcleo da célula promovendo a expressão de genes pró-apoptóticos, como Bim, Txnip e FasL (Figura 4B) (Martel, Wyllie et al. 2009). Além disto, vias neuroprotetoras, como a de fosfoinositol-3-quinase (PI3K) / Proteína quinase do tipo B (Akt) que promovem a exportação nuclear de FOXO, apresentam a sua atividade reduzida (Martel, Wyllie et al. 2009). Alguns estudos apontam que parte da sinalização desencadeada pela excitotoxicidade deve-se aos NMDARs contendo as subunidades GluN1/GluN2B (Figura 4B) (Hardingham and Bading 2010). Estes receptores distribuem-se dinamicamente no neurônio, pois estão presentes ora nos sítios sinápticos, ora nos sítios extrasinápticos, ou até mesmo nos dois sítios; dependendo do estágio de desenvolvimento do neurônio e sua atividade funcional (Tovar and Westbrook 1999, Groc, Heine et al. 2006, Martel, Wyllie et al. 2009, Petralia 2012). Entretanto, mais estudos devem ser realizados quanto ao papel dos NMDARs contendo GluN2B, pois a sua sinalização pode gerar tanto efeitos deletérios que conduzem a morte celular, quanto efeitos neuroprotetores e neurotróficos (Groc, Heine et al. 2006, Martel, Wyllie et al. 2009, Hardingham and Bading 2010).

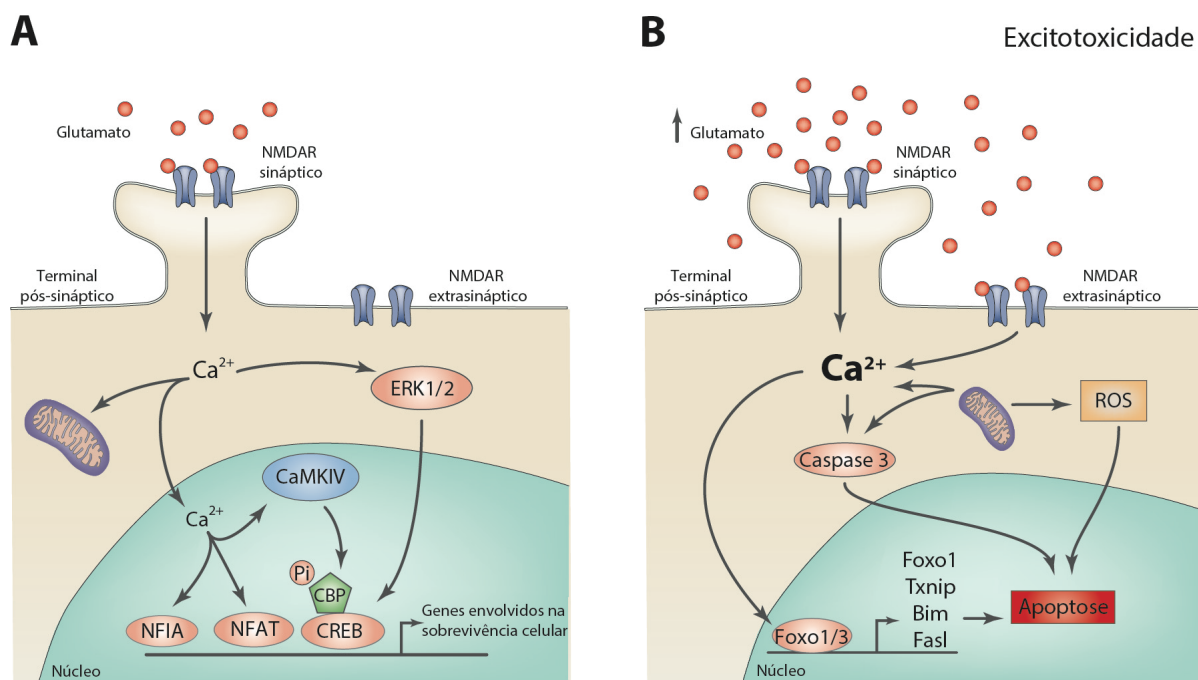


Figura 4. Efeitos opostos gerados pela sinalização dos NMDARs sináptico e extrasináptico frente a excitotoxicidade. A figura esquemática representa um modelo no qual, os NMDARs sinápticos desencadeiam vias neuroprotetoras, enquanto a sinalização mediada pelos NMDARs extrasinápticos contribui para desencadear a morte neuronal. **(A)** NMDARs sinápticos, compostos principalmente pelas subunidades GluN1/GluN2A, localizam-se na zona ativa da sinapse. A liberação do glutamato pelo botão pré-sináptico promove a ativação dos NMDARs e, conseqüentemente, o influxo de Ca^{2+} intracelular. O Ca^{2+} se liga a proteína quinase dependente de Ca^{2+} /Calmodulina do tipo IV (CaMKIV) e também ativa a via da quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2), promovendo a fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclica (CREB). Além do CREB, outros fatores de transcrição (NF1A e NFAT) são ativados pela sinalização mediada pelo influxo de Ca^{2+} . Neste contexto, os mecanismos gerados pela ativação de NMDARs sinápticos promovem a indução de genes envolvidos no neurotrofismo. **(B)** Diferentemente, NMDARs extrasinápticos, compostos principalmente de subunidades GluN1/GluN2B, localizam-se na região perisináptica, distribuído em dendritos e, em alguns casos, adjacente a processos gliais ou axônios. Em insultos ocorridos no SNC, ocorre um aumento da liberação de glutamato na fenda sináptica e, conseqüentemente, uma super ativação dos NMDARs, incluindo aqueles localizados na região extrasináptica. O aumento da atividade dos NMDARs leva ao aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular que pode gerar uma insuficiência da mitocôndria, aumento de espécies reativas ao oxigênio (ROS), ativação de caspases pró-apoptóticas e alterar a expressão de diversos genes via FOXO1. Em conjunto, a super ativação dos NMDARs, promove uma sucessão de eventos que culminam na morte neuronal. Adaptado de (Hardingham and Bading 2010, Benarroch 2011).

1.6 Receptores de NMDA: Alvos terapêuticos

Considerando que a excitotoxicidade é um fenômeno que ocorre em uma ampla variedade de distúrbios neurodegenerativos agudos e crônicos, os NMDARs passaram a ser vistos como um alvo terapêutico potencial (Lipton and Rosenberg 1994). Neste sentido, a proposta de tratamento é modular a sinalização pós-sináptica frente ao insulto de glutamato, pois os mesmos processos que, em excesso, levam a excitotoxicidade, em níveis mais

fisiológicos, são importantes para a manutenção da homeostase neuronal. Os antagonistas de NMDAR portanto, são drogas potenciais pelo fato de serem compostos capazes de modular negativamente a atividade do receptor. Para isto, o tipo e a intensidade da interação dos compostos com o complexo receptor-canal iônico determinam o potencial terapêutico (Figura 3B). Dentre os compostos antagonistas de NMDAR, dois tipos merecem destaque: Antagonistas do tipo competitivo, no qual o bloqueio do receptor advém da ligação do composto químico no mesmo local do agonista, ou seja, no sítio ortostérico. Este tipo de composto possui a desvantagem de anular a atividade do agonista e, dependendo do grau de afinidade do antagonista ao receptor, poderá comprometer algumas funções neuronais tais como a plasticidade sináptica e gerar diversos efeitos adversos (Lipton 2006). Além disto, sendo os NMDARs amplamente expressos nos substratos cerebrais, bem como na maioria dos tipos celulares do cérebro, o seu bloqueio promove uma redução importante da atividade global do SNC justificando os diversos efeitos adversos promovidos pelos seus antagonistas (Olney, Labruyere et al. 1989, Monyer, Burnashev et al. 1994, Conti, Minelli et al. 1997). Há também os antagonistas do tipo não-competitivos que se ligam em um sítio alostérico, ou seja, em um local diferente ao sítio do agonista. Dentre estes compostos, alguns são amplamente utilizados na pesquisa e clínica médica: MK-801, Amantadina, Cetamina e Memantina; e, o seu mecanismo de ação provém do bloqueio dos canais de NMDA, diretamente no sítio de ligação do íon Mg^{2+} (Figura 3B) (Parsons, Danysz et al. 1999, Lipton 2006). Dentre estes compostos, destaca-se a memantina que é uma droga neuroprotetora, amplamente utilizada na clínica médica que, ao inibir a atividade dos NMDARs, promove uma diminuição da entrada excessiva de Ca^{2+} , prevenindo a morte neuronal por excitotoxicidade (Johnson and Kotermanski 2006). A memantina apresenta uma importante tolerabilidade clínica que pode ser atribuída ao mecanismo de inibição transiente e dependente de voltagem, bloqueando preferencialmente NMDAR excessivamente ativados (Chen, Pellegrini et al. 1992). Isso ocorre porque a

memantina não exerce um antagonismo efetivo de NMDAR sinápticos, bloqueando preferencialmente NMDAR extra-sinápticos, os quais estão intimamente associados à ativação de excitotoxicidade (Chen, Pellegrini et al. 1992, Milnerwood, Gladding et al. 2010, Xia, Chen et al. 2010). Assim, apesar do tratamento com a memantina conferir um efeito inibitório sobre os NMDARs, a transmissão sináptica fisiológica é preservada, mantendo inclusive a função cognitiva e produzindo menos efeitos adversos que outros antagonistas de NMDAR (Chen, Wang et al. 1998, Lipton 2004).

Recentemente, demonstramos que o bloqueio do NMDAR pela Memantina previne a morte celular induzida pelo ZIKV em culturas primárias neuronais (Costa, Del Sarto et al. 2017). Camundongos deficientes em receptores de interferon tipo I ($IFN\alpha/\beta R^{-/-}$) infectados com ZIKV exibiram altos níveis de neurodegeneração, microgliose e resposta inflamatória. Entretanto, o tratamento de camundongos $IFN\alpha/\beta R^{-/-}$ infectados com ZIKV com 30 mg/kg de Memantina foi eficiente para prevenir a proliferação da microglia e neurodegeneração em todos os substratos cerebrais testados, incluindo córtex pré-frontal e motor, corpo-estriado e hipocampo. Além disso, o tratamento com a Memantina foi eficaz em prevenir o aumento da contagem total e diferencial de leucócitos no sangue induzidos pelo ZIKV (Costa, Del Sarto et al. 2017). Entretanto, pouco é sabido sobre qual seria o mecanismo de morte neuronal induzido pelo ZIKV e menos ainda se sabe sobre porque o bloqueio de NMDARs seria capaz de prevenir a morte neuronal induzida pelo ZIKV.

Considerando o exposto, postulamos que o ZIKV induz a morte neuronal por promover a liberação de fatores neurotóxicos que culminam em uma ativação exacerbada de NMDARs e, conseqüentemente, a morte neuronal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo caracterizar aspectos celulares e moleculares envolvidos na morte neuronal induzida pelo ZIKV e investigar o mecanismo neuroprotetor promovido pelo bloqueio de NMDARs.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Padronizar e caracterizar o modelo experimental *in vitro* de infecção por ZIKV utilizando cultura primária neuronal de camundongos E15;
- 2- Caracterizar o papel dos NMDARs, contendo GluN2, na morte neuronal induzida pelo ZIKV e o mecanismo de neuroproteção desencadeado pelo seu bloqueio;
- 3- Identificar e caracterizar o papel de fatores pró-apoptóticos liberados na morte neuronal induzida pelo ZIKV.

3. METODOLOGIA

3.1 Camundongos

Este trabalho foi realizado utilizando embriões com 15 dias de gestação (E15), provenientes de camundongos C57BL/6 para os ensaios de cultura primária de neurônios. Os camundongos foram adquiridos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais adultos foram criados e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG em ciclo de 12 horas claro/escuro, com temperatura constante de 22-23°C e recebendo água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho receberam aprovação do CEUA-UFMG (Comissão de Ética no Uso de Animais – UFMG), protocolo de n.º 242/2016.

3.2 Vírus

O isolado viral utilizado neste trabalho, caracterizado pelo baixo número de passagens, é proveniente de um paciente com infecção sintomática, do estado da Bahia/Brasil, durante o ano de 2015. O genoma completo do vírus está disponível no GenBank KX520666. Os estoques deste vírus foram replicados em células de *Aedes albopictus* (C6/36) e titulados segundo descrito em (Costa, Fagundes et al. 2014).

3.3 Cultivo primário de células

1- Cultivo primário de neurônios

As culturas de células neurais foram preparadas a partir do córtex cerebral e corpo estriado de embriões no dia 15 de gestação (E15) de camundongos selvagens C57BL/6. Após a dissecação do cérebro, realizada em solução HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (0,137 M

NaCl; 5,4 mM KCl; 0,25 mM Na₂HPO₄; 0,1 mM glucose; 0,44 mM KH₂PO₄; 1,3 mM CaCl₂; 1,0 mM MgSO₄; 4,2 mM NaHCO₃), o tecido foi submetido a digestão por tripsina e dissociado mecanicamente com pipeta *Pasteur* polida. Os neurônios foram dispostos em placas próprias para cultivo celular, previamente tratadas com poli-L-ornitina (Sigma-Aldrich®) em meio Neurobasal™ (Thermo Fisher Scientific) suplementado com N-2 e B-27® (Gibco™), GlutaMAX™ (Gibco™) 2 mM, antibióticos Penicilina e Estreptomicina (50 mg/ml cada - Gibco™). As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ em uma incubadora com atmosfera umidificada e cultivadas por 12 dias com troca parcial de meio a cada 4 dias.

2- Cultivo primário de células da glia

As culturas de células gliais (cultura mista) foram preparadas a partir do córtex cerebral de camundongos E15 (C57BL/6). Após a dissecação do cérebro, realizada em solução HBSS, o tecido foi incubado no gelo por 1 hora e, posteriormente, dissociado mecanicamente com pipeta sorológica em meio DMEM – *High glucose* (LGC – Biotecnologia), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco™), antibióticos Penicilina e Estreptomicina (50 mg/ml cada - Gibco™). Células da glia foram dispostas em garrafas próprias para cultivo celular, previamente tratadas com poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich®) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ em uma incubadora com atmosfera umidificada, com troca total de meio a cada 4 dias. As células gliais foram sujeitas a 2 passagens antes dos ensaios de infecção.

3.4 Infecção viral e tratamento das células

Cinco dias após a cultura primária dos neurônios, as células foram incubadas com meio contendo o vírus (MOI de 0,1) ou com o sobrenadante obtido do cultivo das células C6/36 não infectadas (MOCK) por 1 hora (período de adsorção). Em seguida, o vírus residual foi lavado e o meio suplementado foi repostado aos neurônios. Ao longo do estudo, foram realizados ensaios

de cinética a fim de avaliar o efeito do ZIKV no cultivo primário de neurônios em 12, 24, 36, 48 e 72 horas após a infecção. Seguido o período de adsorção, os neurônios dos grupos MOCK e infectados com o ZIKV foram tratados com as drogas ifenprodil, etanercept ou IL1-RA e este tratamento era repetido a cada 24 horas nos ensaios de cinética de 36, 48 e 72 horas.

1- Meio condicionado

As culturas de neurônios foram infectadas com o ZIKV (MOI 0,1) por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados e diluídos numa proporção de 50% em DMEM – *High glucose* (LGC – Biotecnologia), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco™), antibióticos Penicilina e Estreptomicina (50 mg/ml cada - Gibco™), referido neste estudo como meio condicionado (M.C.), ver esquema experimental na Figura 20A.

2- Inativação do vírus

Para a inativação do vírus, o M.C. obtido a partir de culturas infectadas com o ZIKV foram submetidos ao aquecimento (94°C durante 15 minutos em banho seco). A inativação do vírus foi avaliada através da análise da curva de dissociação (em °C) gerada no ensaio de RT-qPCR a partir do RNA do M.C. infectado inativado. Os testes mostraram que o M.C. infectado inativado não apresentou a mesma temperatura observada na curva de dissociação do RNA original do ZIKV (dados não mostrados).

3.5 Ensaio de viabilidade celular

A morte neuronal foi determinada utilizando o kit *LIVE/DEAD Cell Viability Assays* (Sigma-Aldrich®) descrito por (Doria, Silva et al. 2013), em diferentes tempos pós infecção (12, 24 e 72 horas). Resumidamente, a marcação dos neurônios com calceína-AM (2 µM) e homodímero de etídeo (2 µM) determina a fração de células vivas e mortas, respectivamente.

Os neurônios foram visualizados por microscopia de fluorescência e as imagens foram capturadas pelo microscópio *FLoid[®] Cell Imaging Station* (Thermo Fisher Scientific). A quantificação do número de células vivas ou mortas foi feita com o auxílio do software ImageJ (Abràmoff, Magalhães et al. 2004, Collins 2007, Schneider, Rasband et al. 2012). Os valores foram expressos como porcentagem do número de células mortas.

3.6 Ensaio de liberação de glutamato

Para analisar a liberação de glutamato pelos neurônios dos grupos infectados ou controle, foi utilizado o “*Ensaio Fluorométrico Ligado a Enzimas*”, segundo protocolo estabelecido por (Nicholls, Sihra et al. 1987). Através desta metodologia, a liberação de glutamato é detectada indiretamente pelo aumento de fluorescência obtida a partir da produção de NADPH na presença de glutamato desidrogenase tipo II e NADP^+ . Culturas neuronais infectadas com ZIKV ou MOCK, por 48 h, foram incubadas com 1 mM de CaCl_2 e 1 mM NADP^+ em solução HBSS e analisada em espectrofluorímetro (Synergy 2, BioTek Instruments, Inc.) através do comprimento de onda de excitação de 360 nm e emissão de 450 nm. Após 5 minutos, foi adicionado glutamato desidrogenase (50 unidades por poço) e as leituras foram reiniciadas até a fluorescência atingir o equilíbrio. As curvas de calibração foram realizadas em paralelo com a adição de quantidades conhecidas de glutamato (5 nM/mL) ao meio de reação. Os níveis de glutamato detectado foram normalizados pela quantidade total de proteína por poço. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem, tendo como referência a liberação basal de glutamato (tempo 0) como 100%. Os ensaios foram realizados à 37°C, em triplicata para cada condição.

3.7 Aferição da concentração de Ca^{2+} intracelular

A aferição da concentração de Ca^{2+} livre no citosol foi realizada usando o método “Éster Fura-2-acetoxi metílico”(Fura-2AM) como previamente relatado por (Toivari, Manninen et al. 2011). Resumidamente, culturas neuronais, infectadas com ZIKV ou MOCK, foram incubadas com 0,2 μM de Fura-2 AM por 20 min a 37°C. O meio suplementado foi removido dos poços e os neurônios foram lavados com HBSS. Um feixe de luz alternada de comprimento de onda de 340 e 380 nm foi incidido aos poços e, posteriormente, um feixe de 510 nm foi detectado pelo espectrofluorímetro PTI (Synergy 2, BioTek Instruments, Inc.). No final de cada experimento, foi adicionado dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS) (0,1% final) para obter R_{max} seguido por Tris 3 M + EGTA 400 mM (pH 8,6) para R_{min} . Todos os experimentos foram realizados em triplicata para cada condição.

3.8 Ensaio de imunoblot de proteínas (Western Blot)

A fim de quantificar as proteínas CREB e ERK 1/2 fosforiladas, foi realizado o ensaio de imunoblot de proteínas, também conhecido como *Western Blot*. Resumidamente, nos tempos de 12 e 24 horas após a infecção por ZIKV ou MOCK, neurônios tratados ou não com ifenprodil, foram lisados em tampão RIPA (0,15 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2, 0,05 M EDTA, 1% nonidet P40, 1% TritonX-100, 0,05% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS) contendo inibidor de protease SIGMAFAST™ (Sigma®). As amostras de cada grupo foram preparadas contendo 100 μg de proteína celular total e corridas em um gel de poliacrilamida do tipo SDS-PAGE, seguido por eletroblotting (transferência) em membrana de nitrocelulose. As membranas foram submetidas ao bloqueio com tampão TBST (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 e 0,05 Tween 20) contendo 5% de BSA por 1 hora, seguido de incubação *overnight*, a 4°C com os anticorpos primários. Os anticorpos utilizados neste estudo, anti-*rabbit* p-CREB (1:500) ou anti-*rabbit* p-ERK (Thr202/Thr204) (1:1000), foram diluídos em tampão

TBS com 3% de BSA. As membranas foram lavadas três vezes em tampão TBS e, posteriormente, incubadas em anticorpo secundário IgG anti-*rabbit* conjugado com peroxidase (1:5000), diluído em tampão TBST com 3% de BSA pelo período de 1 hora. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes, incubadas em reagente de detecção para *western blot ECL prime* (GE Healthcare), digitalizadas e analisadas na plataforma *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare). Em um segundo momento, estes anticorpos foram removidos da membrana utilizando solução de *stripping* (0,1 M glicina, 20 mM acetato de magnésio, 50 mM KCl, pH 2,2) e as membranas foram incubadas com anti-*mouse* CREB total (diluição 1:700) ou anti-*rabbit* ERK 1/2 (1:1000) *overnight*, a 4°C. As membranas foram então submetidas a uma segunda marcação pelos anticorpos secundários: anti-*mouse* IgG (1:2500) ou anti-*rabbit* IgG (1:5000) para determinar a expressão total de CREB e ERK 1/2, respectivamente. Bandas não saturadas relativas às proteínas CREB e ERK 1/2 foram quantificadas pela plataforma *ImageQuant™ LAS 4000* (GE – Healthcare). A intensidade das bandas detectadas foi calculada através do *software* *ImageJ* (Schneider, Rasband et al. 2012) e utilizadas para análise. A normalização dos dados foi realizada através do número de pixels identificado nas bandas de p-CREB e p-ERK dividido pelo número de pixels detectados em CREB e ERK totais, respectivamente.

3.9 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

A concentração das citocinas (IL-1 β e TNF- α) foi mensurada no sobrenadante das culturas neuronais, nos períodos de 12, 24 ou 48 h após a infecção por ZIKV ou MOCK, pelo método de ELISA. O ensaio foi realizado com anticorpos comercialmente disponíveis e de acordo com os procedimentos contidos no boletim fornecido pelo fabricante (R & D Systems). Resumidamente, foram utilizadas microplacas rígidas contendo 96 poços e o volume das soluções distribuídas em todas as etapas foi de 100 μ L por poço. As placas foram devidamente

sensibilizadas com o anticorpo de captura e incubadas *overnight*. Após esse processo de sensibilização, as placas foram então lavadas e bloqueadas com 200 µL de solução BSA a 1% por 1 hora e, novamente, lavada duas vezes. Em seguida, foi adicionado as diluições para estabelecimento da curva padrão de referência, bem como as amostras, em duplicata, e uma nova incubação foi realizada em equipamento agitador próprio, de 300 rpm, a 37 °C, por 2 horas. As amostras foram descartadas e os poços foram lavados 1 vez. 100 µL do anticorpo de detecção foi adicionado aos poços e as placas foram reincubadas por 2 horas. Entre cada lavagem, foi adicionada estreptavidina durante 20 min, seguida da adição de substrato o-fenilenodiamina (OPD Sigma) durante 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL da solução de parada (H₂SO₄). A leitura da curva padrão bem como das amostras foram lidas em um espectrofotômetro a 490 nm. O limite de detecção de cada kit é de 4 a 8 pg/mL.

3.10 Ensaio de Imunofluorescência

A fim de visualizar e diferenciar os neurônios infectados com o ZIKV e/ou em processo de apoptose celular foi realizado um ensaio de imunofluorescência. Resumidamente, 48 horas após a infecção por ZIKV ou MOCK, as culturas neuronais foram lavadas utilizando tampão fosfato-salino (PBS) (137 mM NaCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,76 mM KH₂PO₄; 2,7 mM KCl; pH 7,4) e fixado em solução de formaldeído 4% em PBS por 30 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes em PBS e permeabilizadas em solução PBS-Triton 0,3% por 20 minutos. Os anticorpos primários utilizados neste estudo anti-*mouse* 4G2 (diluição 1:300), anti-*mouse* NeuN (diluição 1:500), anti-*rabbit* caspase ativa 3 (diluição 1:500) e anti-*rabbit* Iba1 (diluição 1:500), foram diluídos em solução permeabilizante e as células foram incubadas com os anticorpos *overnight*, a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes em PBS e incubadas por 1 hora em anticorpos de cabra anti-*mouse* conjugado com Alexa Fluor 546 (diluição 1:500) e anti-*rabbit* conjugado com Alexa Fluor 488 (diluição 1:500), também

preparados em solução permeabilizante. Para marcar o núcleo, foi utilizado NucBlue™ juntamente ao DAPI. A aquisição de imagens foi realizada na plataforma *Zeiss LSM 880 Confocal System* (Zeiss), equipado com uma lente objetiva de 40×/1.30 oil DIC M27, e o *software “Zen 2”* (Zeiss). DAPI foi detectado entre os comprimentos de 410 e 496 nm; anticorpos marcados com Alexa Fluor 488 e 546 foram detectados entre 499-555 e 560-679 nm, respectivamente. A excitação sequencial de fluoróforos foi realizada utilizando lasers de 405, 488 e 532 nm para DAPI, Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 546, respectivamente.

3.11 Ensaio de PCR em tempo real (RT-qPCR)

Para todos os procedimentos realizados abaixo foram utilizados instrumentos esterilizados por autoclavagem ou tratados com a solução de descontaminação por RNAses RNaseZap® (Ambion®).

1- Coleta das amostras de cultura de células

As amostras de cultura celular foram obtidas após 5 ou 6 dias da realização da cultura primária dos neurônios. Foi retirado todo o meio de cultura celular da placa contendo as células e adicionado TRIzol® Reagent (Tabela 2). A lise e homogeneização das células foram feitas mecanicamente através de pipetagem para cima e para baixo, seguida de agitação em vortex.

Tabela 2. Volumes (em µL) dos reagentes utilizados para a extração de RNA total.

Tecido/células	TRIzol®	Clorofórmio	Isopropanol
Cultura de células (Poço individual de uma placa contendo 12 poços)	500	100	250

2- Extração do RNA total

O homogeneizado obtido foi incubado por 15 minutos à temperatura ambiente e foi então adicionado o clorofórmio (Sigma®) (Tabela 2) seguido de agitação em vortex por 30

segundos. Após incubação por 10 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 12 minutos a 12.000×g em microcentrífuga a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado 5 µg de glicogênio ultrapuro (Ambion[®]) em cada amostra. Foi adicionado isopropanol (Sigma[®]) (Tabela 2) seguido de agitação em vortex por 30 segundos e, após incubação por 60 minutos em freezer -20°C, as amostras foram novamente centrifugadas por 12 min a 12.000×g. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado em cada tubo 1 mL de etanol 75% v/v (Sigma[®]) preparado utilizando água livre de nucleases (Nuclease-Free Water – Ambion[®]). Os tubos foram então centrifugados por 5 minutos a 7.500×g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco pela inversão dos tubos em papel absorvente. Após a secagem do RNA, este foi ressuscitado em 15 µL de água livre de nucleases e aquecidas a 37°C em banho seco por 10 min. As amostras de RNA foram estocadas em freezer -80°C até o momento do uso.

3- Transcrição reversa (RT-PCR)

O cDNA foi sintetizado utilizando a enzima Transcriptase Reversa M-MLV (Promega[®]), com tampão da enzima (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂), 2,0 µg de RNA total, 15mM de Random Primers 6 mer (Invitrogen), 625 µM de dNTPs, 0,01 M de DTT e água livre de nucleases para um volume final de 20 µL. Primeiramente, foi feita a desnaturação do RNA através da incubação da mistura RNA e Random Primers a 70°C em termociclador durante 10 min, seguido de banho de gelo. Em seguida, foram adicionados o tampão da enzima, DTT e 2 U da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, essa mistura foi incubada novamente em termociclador a 42°C durante 60 min e 72°C por 5 min. Por fim, a amostra foi estocada a -20°C até o momento do uso.

Foram feitos controles sem a presença da enzima RT em todas as reações de transcrição reversa a fim de avaliar a possível contaminação com DNA, tendo em vista que não é feito o tratamento com DNase nas amostras de RNA total.

4- Desenho dos iniciadores

O desenho dos iniciadores para o PCR quantitativo (RT-qPCR) foi feito utilizando o software Primer3Plus (Untergasser, Cutcutache et al. 2012), com pequenas modificações nos parâmetros padrões, sendo o tamanho do amplicon entre 87 e 211 nt, a temperatura ideal de anelamento em 60°C e conteúdo GC ideal de 50%, descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR.

Gene	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Tm °C	%GC	Nº identificador
TNF. F	GCTGAGCTCAAACCCTGGTA	118	59,68	55,0	NM_013693
TNF. R	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG		58,37	55,0	
Il1b. F	GGGCCTCAAAGGAAAGAATC	183	56,37	50,0	NM_008361.4
Il1b. R	TACCAGTTGGGGA ACTCTGC		59,31	55,0	
Gls. F	GGCAAAGGCATTCTATTGGA	132	56,06	45,0	NM_001081081.2
Gls. R	TTGGCTCCTTCCCAACATAG		57,19	50,0	
Slc1a2. F	ATTGGTGCAGCCAGTATTCC	196	58,23	50,0	NM_001077514.3
Slc1a2. R	CCAGCTCAGACTTGGA AAGG		58,18	55,0	
NR1. F	ACTCCCAACGACCACTTCAC	186	59,89	55,0	NM_008169.3
NR1. R	GTAGACGCGCATCATCTCAA		58,16	50,0	
NR2A. F	TACTCCAGCGCTGAACATTG	167	58,27	50,0	NM_008170.2
NR2A. R	CATGCGTGATGAGGCTCTTA		57,77	50,0	
NR2B. F	GTGAGAGCTCCTTTGCCAAC	124	59,12	55,0	NM_008171.3
NR2B. R	ATGAAAGGGTTTTGCGTGAC		57,21	45,0	
NR3A. F	ATGGGCATCAAGCATTCTC	116	56,44	45,0	NM_001276355.1
NR3A. R	TTGATTCGTGGTAGCAGCAG		58,27	50,0	
ZIKV. F	TCAAACGAATGGCAGTCAGTG	183	59,13	47,6	KX197192.1
ZIKV. R	GCTTGTTGAAGTGGTGGGAG		59,05	55,0	
Rpl32. F	GCTGCCATCTGTTTTACGG	98	57,00	52,6	NM_172086.2
Rpl32. R	TGACTGGTGCCTGATGAACT		58,94	50,0	

5- PCR quantitativo

Para análise dos níveis de expressão dos genes foi utilizada a técnica de RT-qPCR, conhecida como PCR quantitativo. As reações de quantificação dos genes foram realizadas utilizando o kit Power SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied® Biosystems). As reações foram executadas conforme os boletins técnicos do fabricante, utilizando o equipamento StepOnePlus™ RealTime PCR System (Applied® Biosystems) ou QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied® Biosystems). Algumas adaptações quanto às concentrações dos iniciadores utilizados foram realizadas a fim de assegurar a confiabilidade e eficiência da reação de RT-qPCR. A concentração final do par de iniciadores do ZIKV foi de 0,4 µM e, para os demais iniciadores, a concentração final foi de 0,08 µM. As análises dos dados foram realizadas utilizando o método do $2^{-\Delta Ct}$ calculado em relação ao gene de referência *RPL32* (Tabela 3).

3.12 Análise dos dados

Para os resultados do qPCR e ensaios de viabilidade celular, a média e o erro padrão foram calculados a partir de pelo menos três replicatas biológicas, como indicado nas legendas das figuras. Para amostras com 1 variável foi utilizado o teste *t* de Student, e para amostras com 2 variáveis foi utilizado o teste ANOVA de duas vias, com pós-teste de Bonferroni. Em ambos os métodos, as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPadPrism® versão 5 (GraphPad Software Inc.), sendo considerados significativos os testes que obtiveram valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Modelo experimental da infecção pelo ZIKV em cultura primária de neurônios

No presente trabalho, os mecanismos subjacentes à infecção mediada pelo ZIKV em neurônios foram estudados com o emprego de culturas primárias de neurônios das regiões córtico-estriatais de embriões E15 de camundongos C57BL/6. Em ensaio de imunofluorescência foi observado que pelo menos 99,5% (1.030 de 1.035) das células em cultivo são neurônios, pois estas se mostraram positivas para o marcador neuronal NeuN (Figura 5A e B). Apenas 0,5% (5 de 846) das células analisadas são gliais, visto que marcaram positivamente para Iba1, um marcador de micróglia. Além disto, não foram encontradas células positivas para a proteína ácida fibrilar glial, um marcador específico para astrócito.

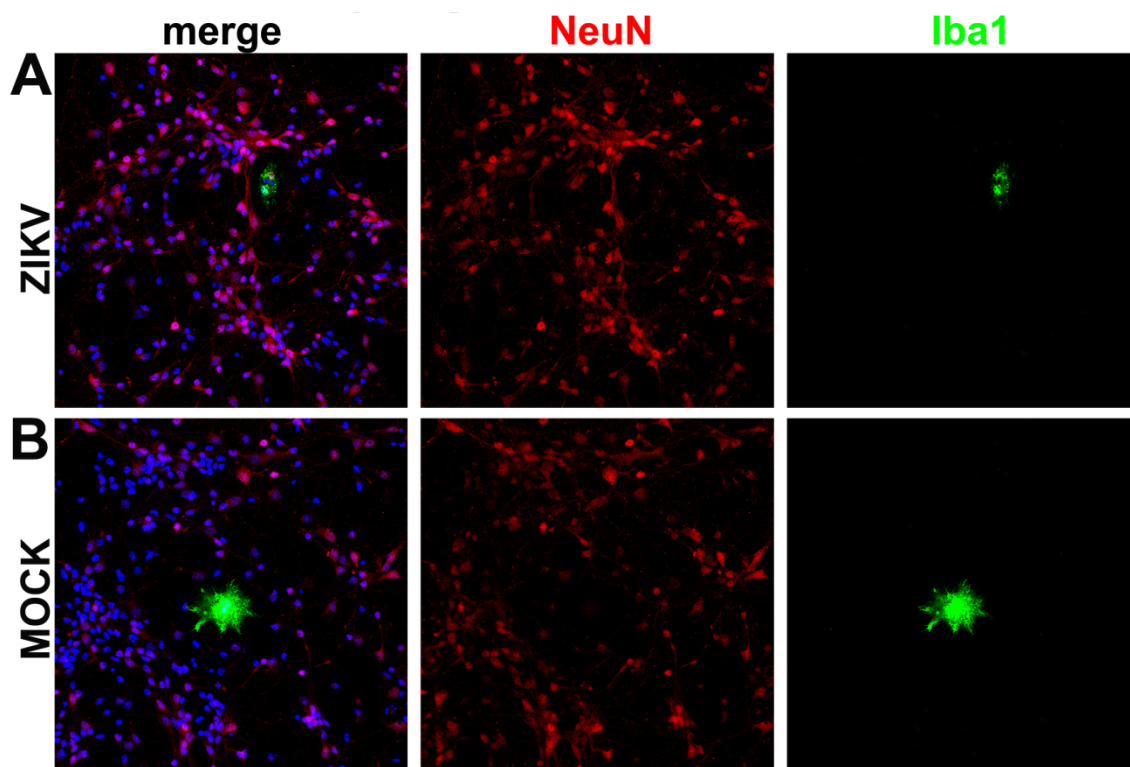


Figura 5. Legenda na próxima página.

Figura 5. Culturas primárias de células córtico-estriatais são compostas predominantemente por neurônios. Micrografias representativas, obtidas em microscópio do tipo confocal, de culturas primária de neurônios córtico-estriatais infectados com ZIKV (A) ou controle (MOCK) (B), 48 horas após a infecção. A marcação por imunofluorescência foi realizada utilizando anticorpos anti-NeuN (vermelho), anti-Iba1 (verde). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). Os painéis à esquerda mostram a imagem mesclada dos três marcadores fluorescentes. As imagens foram adquiridas para 5 campos aleatórios de cada lâmina, e o percentual de células marcadas com anti-NeuN e anti-Iba1 foi determinado em relação ao número de células marcadas com DAPI. Nove lâminas contendo culturas neuronais foram analisadas para cada condição (ZIKV ou MOCK) em 3 experimentos independentes. Os percentuais descritos no texto representam as médias, n=3.

Nos ensaios experimentais foram utilizados neurônios em cultura primária, cultivados *in vitro* por 5 dias (DIV5). Embora o cultivo primário DIV5 já apresentar elementos morfológicos típicos de neurônios como ramificações dendríticas, as células ainda são consideradas imaturas por apresentarem menor expressão de receptores sinápticos, menores taxas de neurotransmissores, bem como um metabolismo energético ainda em desenvolvimento (Lesuisse and Martin 2002, Agostini, Romeo et al. 2016). Além disto, estudos demonstram que neurônios imaturos são mais vulneráveis a infecção por vírus, o que coloca esta fase do desenvolvimento como um bom modelo para o nosso estudo (Ahn, Jee et al. 2008, Kole, Annis et al. 2013, Hughes, Addanki et al. 2016). As infecções foram realizadas com o vírus da Zika (ZIKV) isolado de um paciente sintomático do estado da Bahia/Brasil, em 2015 (isolado HS-2015-BA-01, *GenBank*: KX520666), multiplicado em células C6/36 de *Aedes albopictus* e coletado a partir do sobrenadante celular. As culturas de neurônios controle (MOCK), por sua vez, foram incubadas com o meio sobrenadante de células C6/36, não infectadas, a fim de mimetizar a condição ofertada aos neurônios infectados pelo ZIKV. Com o objetivo de caracterizar a infecção do ZIKV em cultura primária de neurônios, foi realizado um ensaio de RT-qPCR para mensurar a infecção viral em relação ao número de cópias do genoma viral, em diversos tempos pós-infecção. Foi observado um aumento significativo dos níveis de ZIKV no tempo de 12 horas e níveis ainda maiores de RNA do ZIKV nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a infecção, quando comparado ao grupo controle-infectado (Figura 6A).

Por outro lado, não foi observado aumento de expressão de RNA viral no grupo infectado em tempos inferiores a 12h (dados não mostrados).

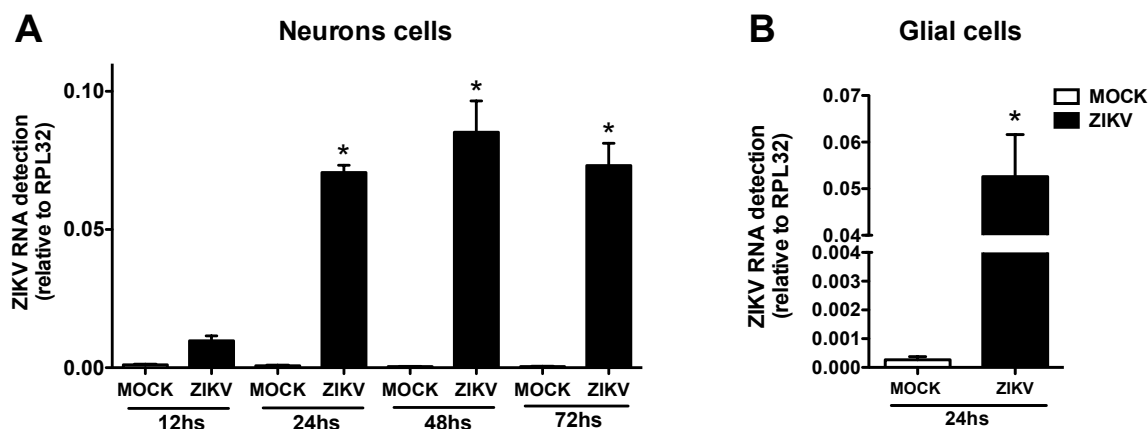


Figura 6. Níveis de RNA do ZIKV em cultura primária de neurônios e de células da glia. O gráfico mostra os níveis de RNA do ZIKV em neurônios primários córtico-estriatais nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas (A) e em células primárias gliais (B) no tempo de 24 horas após a infecção por ZIKV ou controle (MOCK). Os níveis de RNA do ZIKV foram avaliados por RT-qPCR, em triplicata biológica e normalizada pelo mRNA do gene de referência *RPL32*. Os dados representam as médias \pm SEM, $n = 4$. (*) indica diferença significativa comparando com o grupo MOCK ($p < 0,05$).

Estudos apontam que não somente os neurônios são susceptíveis a infecções pelo ZIKV, mas as células da glia também estão sujeitas a entrada e replicação viral, potencializando os efeitos deletérios do vírus no SNC (Lum, Low et al. 2017, Meertens, Labeau et al. 2017). Desta forma, realizamos o ensaio de RT-qPCR a fim de quantificar a replicação viral do ZIKV em cultura primária de células gliais contendo astrócitos e micróglias. Corroborando os estudos prévios, 24 horas após a infecção pelo ZIKV, foi observado um aumento significativo dos níveis de RNA do vírus em células gliais comparado ao controle (Figura 6B). Embora confirmarmos a susceptibilidade tanto de neurônios quanto de células da glia à infecção pelo ZIKV, a infecção pelo vírus não incitou alterações na composição celular das culturas de neurônios. Assim, realizamos um ensaio de imunofluorescência para verificar se o aumento da replicação do vírus, observado nos neurônios primários estaria associado também a infecção das células da glia contidas nestas culturas. Foi observado que, 48 horas após a infecção pelo

vírus, o número de células da glia ($0,5 \pm 0,23\%$) não sofreu aumento comparado com o controle não infectado ($0,5 \pm 0,22\%$) (Figura 5A e B). Além disso, não foi observada a presença do ZIKV nas micróglia presentes nesta cultura. Os dados acima indicam que as culturas de células primárias neuronais empregadas neste trabalho são majoritariamente compostas por neurônios. Além disto, a replicação viral observada nestas culturas ocorre exclusivamente em células neuronais.

4.2 O ZIKV induz a apoptose neuronal através de um mecanismo não-autônomo

Nosso grupo já demonstrou previamente que o ZIKV é capaz de desencadear a morte de neurônios murinos em cultura primária (Costa, Del Sarto et al. 2017). Considerando que o crescimento viral do ZIKV se torna significativo a partir de 12 horas após a infecção em neurônios (Figura 6A), nós decidimos investigar se havia correlação entre o aumento da carga viral e a morte celular mediada pelo ZIKV. Para isto, foi realizado um ensaio de viabilidade celular em diferentes tempos após a infecção e os resultados obtidos demonstram que, nos neurônios infectados com ZIKV, há um aumento da taxa de morte neuronal significativa somente a partir de 24 horas pós-infecção quando comparado ao grupo controle (Figura 7B). Portanto, o período anterior às primeiras 24 h da infecção pelo ZIKV representa um tempo chave no qual é possível identificar aumento da multiplicação viral sem morte neuronal evidente (Figura 7B).

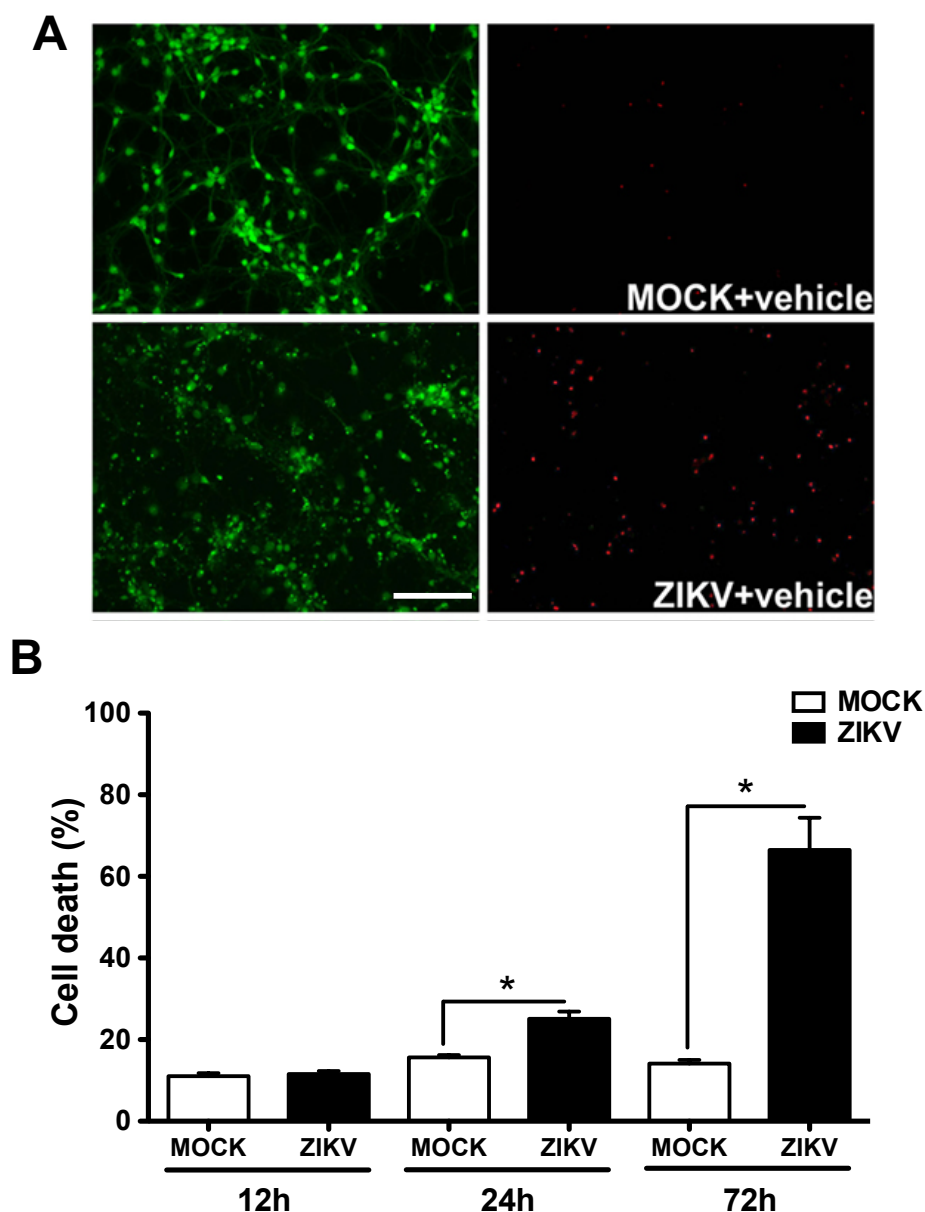


Figura 7. O ZIKV promove neurodegeneração em culturas primárias de neurônios. (A) Micrografias representativas, obtidas em microscópio de fluorescência, de neurônios primários córtico-estriatais marcados com calceína AM (verdes, células vivas) e homodímero de etídio-1 (vermelho, células mortas), 48 horas após infecção com o ZIKV ou controle (MOCK). A barra de tamanho corresponde a 50 μ m em todas as imagens. (B) O gráfico mostra a porcentagem de morte neuronal por 12, 24 ou 72 horas após infecção por ZIKV ou MOCK. Os dados representam as médias \pm SEM, n = 4. (*) indica diferenças significativas (p < 0,05).

Com o objetivo de melhor caracterizar a morte neuronal induzida pelo ZIKV, neurônios primários foram imunomarcados simultaneamente com anticorpos para a proteína do envelope do ZIKV (anti-4G2) e anticorpos para a caspase 3 ativa. No tempo de 48 horas após a infecção, aproximadamente um terço ($28,0 \pm 2,35\%$) das células presentes nas culturas infectadas pelo ZIKV mostraram-se positivas para a forma ativa da caspase 3 (Figura 8A e C), comparado a

11,51 ± 1,43% das células MOCK-infectadas (Figura 8B e C). Nossas observações sugerem que a infecção por ZIKV desencadeia a apoptose. De maneira interessante, neste mesmo ensaio foi identificado que, para cada célula positiva para o ZIKV, foram encontradas até 228 células positivas para a caspase 3 ativa. De fato, a maioria dos neurônios positivos para o ZIKV estava cercada por neurônios com marcação positiva para caspase 3 que, aparentemente, não apresentavam infecção pelo vírus (Figura 8A). Contudo, observamos que os níveis de infecção do ZIKV detectados pelo método de imunofluorescência são aparentemente baixos quando comparamos com a saturação do genoma viral pelo método de RT-qPCR (Figura 6A). Parte desta discordância pode ser justificada pela maior sensibilidade do método RT-qPCR na detecção de patógenos quando comparado às análises por imunofluorescência (Skog, Ingvast et al. 2014, Moodley, Tempia et al. 2017). Em conjunto, os dados acima sugerem que o ZIKV pode desencadear a apoptose celular de maneira não autônoma, nos levando a formular a hipótese de que os neurônios infectados pelo ZIKV poderiam liberar fatores pró-apoptóticos que desencadeiam a morte de células neuronais adjacentes.

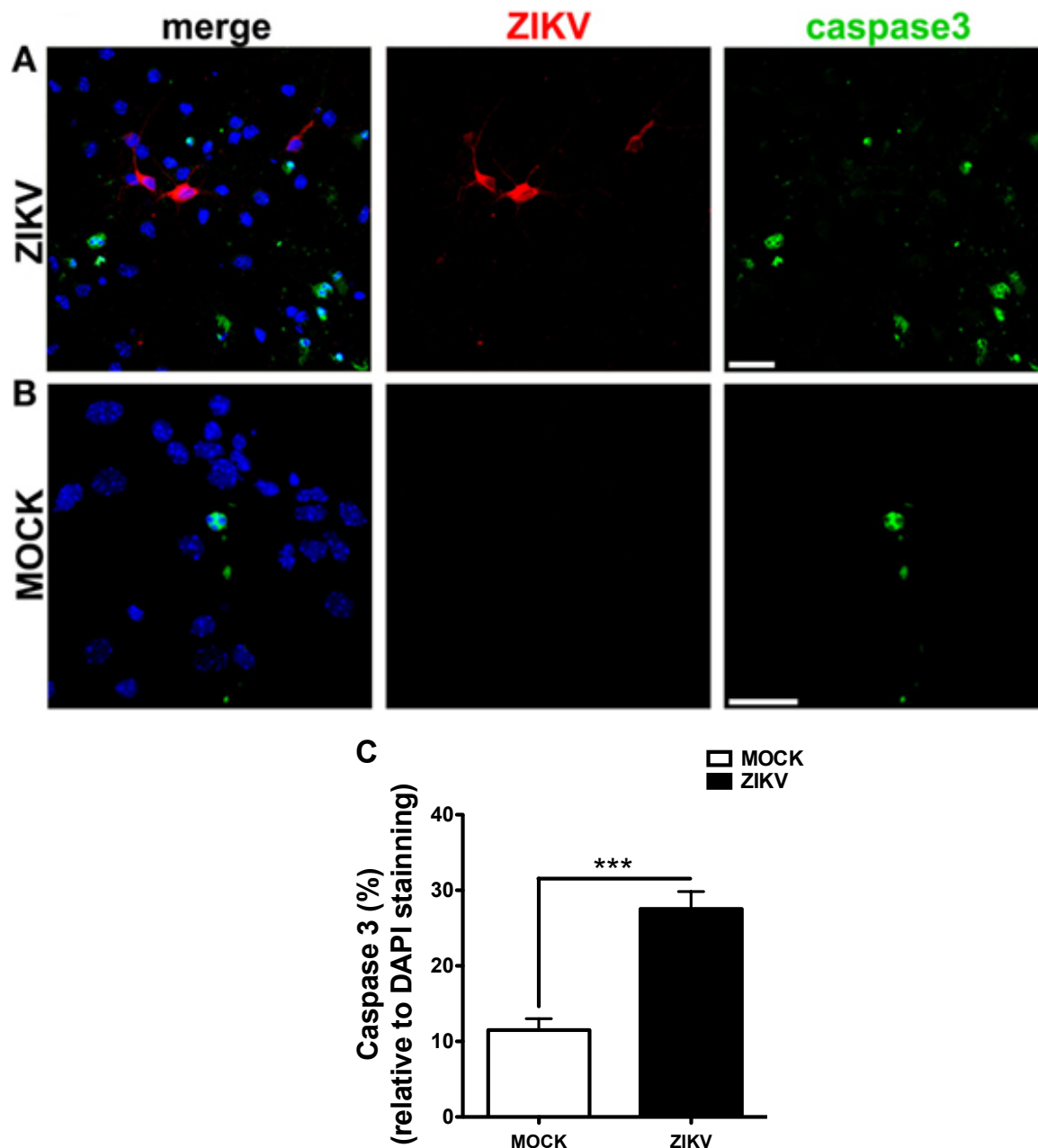


Figura 8. O ZIKV induz a apoptose celular através de um mecanismo não-autônomo. Micrografias representativas, obtidas em microscópio do tipo confocal, de cultura primária de neurônios córtico-estriatais infectados com ZIKV (A) ou controle (MOCK) (B), 48 horas após a infecção. A marcação por imunofluorescência foi realizada utilizando anticorpos anti-4G2 (vermelho), anti-caspase 3 ativa (verde). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). Os painéis à esquerda mostram a imagem mesclada dos três marcadores fluorescentes. A barra de tamanho corresponde a 20 μ m em todas as imagens. (C) O gráfico mostra a porcentagem de células marcadas com caspase 3, em culturas infectadas por ZIKV ou MOCK. As imagens foram adquiridas para 5 campos aleatórios de cada lâmina, e o percentual de células caspase-positivas foi determinado em relação ao número de células marcadas com DAPI. Nove lâminas contendo culturas neuronais foram analisadas para cada condição (ZIKV ou MOCK) em 3 experimentos independentes, o que possibilitou a análise de um total de 881 (ZIKV) e 888 (MOCK) células. Os dados representam as médias \pm SEM, n=3. (***) indica diferenças significativas (p < 0,0001).

4.3 O vírus da Zika induz a morte neuronal via ativação do GluN2B

Diversas injúrias que acometem o SNC, tais como hipóxia, traumas mecânicos, doenças neurodegenerativas progressivas e/ou agudas, podem induzir um aumento da liberação de glutamato que pode desencadear a morte de neurônios adjacentes àqueles que sofreram o dano (Bondy and LeBel 1993). Dessa forma, nós analisamos os níveis de glutamato liberados nas culturas neuronais infectadas pelo ZIKV através da metodologia descrita por (Nicholls, Sihra et al. 1987). Em nossos ensaios foi observado que os níveis de glutamato aumentaram progressivamente nos neurônios infectados com ZIKV em comparação ao controle (Figura 9A). Embora haja uma tendência de aumento nos níveis de glutamato 12 horas após infecção, observamos uma diferença significativa apenas a partir de 24 horas após a infecção pelo ZIKV (Figura 9A). Níveis patológicos de glutamato no interstício podem desencadear a superativação de receptores glutamatérgicos pós-sinápticos, permitindo que altos níveis de íons Ca^{2+} entrem na célula (Choi 1987, Choi, Maulucci-Gedde et al. 1987, Choi, Koh et al. 1988, Zanelli, Numagami et al. 1999). Utilizando o ensaio de “Fura-2 AM” (Toivari, Manninen et al. 2011), foi avaliado se os níveis de Ca^{2+} intracelulares estavam aumentados nas culturas de neurônios infectadas com o ZIKV. No tempo de 48 horas após a infecção, os níveis de Ca^{2+} intracelular estavam significativamente aumentados nos neurônios infectados com o ZIKV, em comparação ao controle (Figura 9B). Os eventos observados podem explicar parcialmente os mecanismos subjacentes à morte neuronal mediada pelo ZIKV.

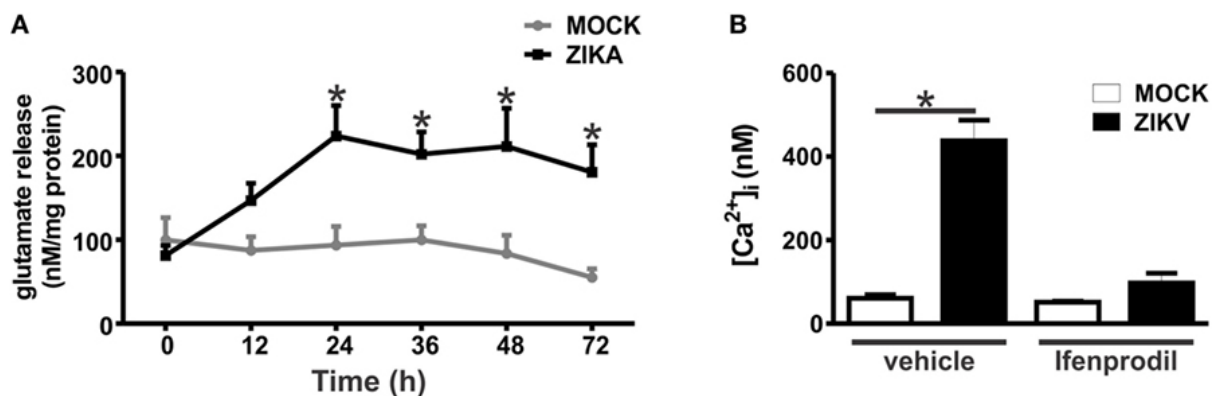


Figura 9. A infecção pelo ZIKV induz níveis aumentados de glutamato extracelular e aumento do fluxo de Ca²⁺ intracelular através da subunidade GluN2B. (A) O gráfico mostra uma linha de tempo correspondente aos níveis de concentração de glutamato extracelular em neurônios córtico-estriatais em cultura primária infectados com ZIKV ou controle (MOCK). Os dados representam as médias \pm SEM, n = 6–10. (*) indica diferença significativa em relação aos neurônios controle (p < 0,05). (B) O gráfico mostra os níveis de concentração de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) em neurônios córtico-estriatais em cultura primária que não foram tratados (veículo) ou tratados com 0,01 μ M de ifenprodil por 48 h após a infecção por ZIKV ou controle (MOCK). Os dados representam as médias \pm SEM, n = 4–8. (*) indica diferença significativa (p < 0,05).

Os receptores de NMDA são canais do tipo iônico, dependentes de glutamato e, quando ativados acima dos níveis fisiológicos, estão envolvidos na excitotoxicidade neuronal (Zanelli, Numagami et al. 1999). Para avaliar se o bloqueio do NMDAR é capaz de reverter a morte neuronal mediada pelo ZIKV, foi testado o efeito do antagonista de NMDAR, Dizocilpina (MK-801), na viabilidade celular, em culturas neuronais infectadas pelo vírus e culturas controle. O MK-801 é um antagonista não competitivo do NMDAR que se liga no interior do canal, impedindo o fluxo de íons (Wong, Kemp et al. 1986). Dentre as doses testadas do MK-801 (1, 10 e 100 μ M), os resultados mostraram que, 72 horas após a infecção pelo ZIKV, a morte neuronal foi reduzida significativamente na dose de 10 μ M e, na dose de 100 μ M, a morte neuronal se mostrou equivalente ao controle (Figura 10A). Este resultado corrobora observações descritas em um artigo publicado anteriormente por nosso grupo, onde demonstramos que o antagonismo do NMDAR promovido por outros bloqueadores, tais como Agmatina e Memantina, também reduzem significativamente a morte neuronal induzida pelo ZIKV (Costa, Del Sarto et al. 2017).

Ainda neste sentido, resultados de outros grupos mostram que a subunidade GluN2B, contida no NMDAR, possui um papel importante na sinalização excitotóxica de neurônios submetidos à injúria (Tu, Xu et al. 2010, Martel, Ryan et al. 2012). Sendo assim, para verificar a ação desta subunidade na excitotoxicidade promovida pelo ZIKV, foi avaliado o efeito do inibidor seletivo do receptor de NMDA contendo GluN2B, o Ifenprodil (Williams 2001), na viabilidade celular de culturas neuronais, nas doses de 0,01, 0,1 e 1 μM . Os resultados obtidos mostraram que a dose de 0,01 μM foi efetiva em reduzir significativamente a morte neuronal promovida pela infecção viral, quando comparado ao grupo infectado pelo ZIKV e tratado com o veículo utilizado para dissolver a droga (Figura 10B). Após determinar qual a dose efetiva do Ifenprodil, foi realizado um ensaio adicional a fim de confirmar se o tratamento com Ifenprodil (0,01 μM) é capaz de manter a sobrevivência neuronal nos tempos de 12, 24 e 72 horas após a infecção pelo ZIKV. Em ensaio de viabilidade celular, o bloqueio de NMDAR contendo GluR2B pelo Ifenprodil reduziu significativamente a morte neuronal desencadeada pelo ZIKV nos tempos de 24 e 72 horas após a infecção pelo vírus, quando comparado ao grupo controle (Figura 11).

Considerando o aumento do influxo de Ca^{2+} observado após a infecção pelo ZIKV, nós verificamos a participação da subunidade GluN2B neste fenômeno. Para isto, foi realizado o ensaio para medir a concentração de Ca^{2+} intracelular, nas culturas neuronais infectadas ou não com o ZIKV e tratadas com Ifenprodil. O tratamento com 0,01 μM de Ifenprodil foi eficiente para resgatar significativamente o aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular exibidos pelas culturas infectadas pelo ZIKV (Figura 9B), indicando que os NMDAR contendo GluN2B são canais importantes no aumento da entrada de Ca^{2+} desencadeada pela infecção pelo ZIKV.

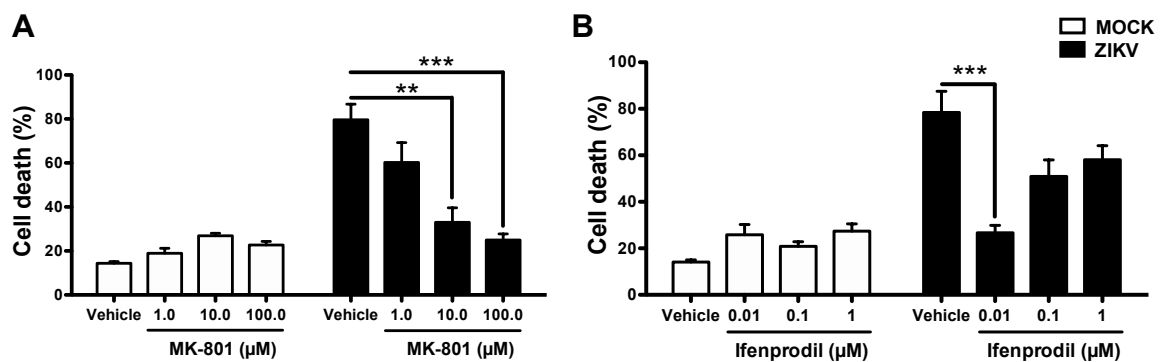


Figura 10. O bloqueio do NMDAR previne a morte neuronal induzida pelo ZIKV em cultura primária de neurônios. O gráfico mostra a porcentagem de morte celular de neurônios córtico-estriatais em cultura primária que foram infectados com ZIKV ou controle (MOCK). O tratamento com o antagonista de NMDAR foi realizado após a infecção (tempo de adsorção) e a cada 24 horas. O ensaio de viabilidade celular (*LIVE/DEAD*) foi realizado 72 horas após a infecção pelo ZIKV. Os tratamentos com as drogas MK-801 e Ifenprodil foram realizados em diferentes concentrações: 1; 10 e 100 µM para MK-801 (**A**) e 0,01; 1; 10 µM para Ifenprodil (**B**). Os resultados são representados como porcentagem de neurônios mortos. Os resultados são expressos como média \pm SEM, n=4. *, P < 0,05 em comparação com neurônios infectados com ZIKV.

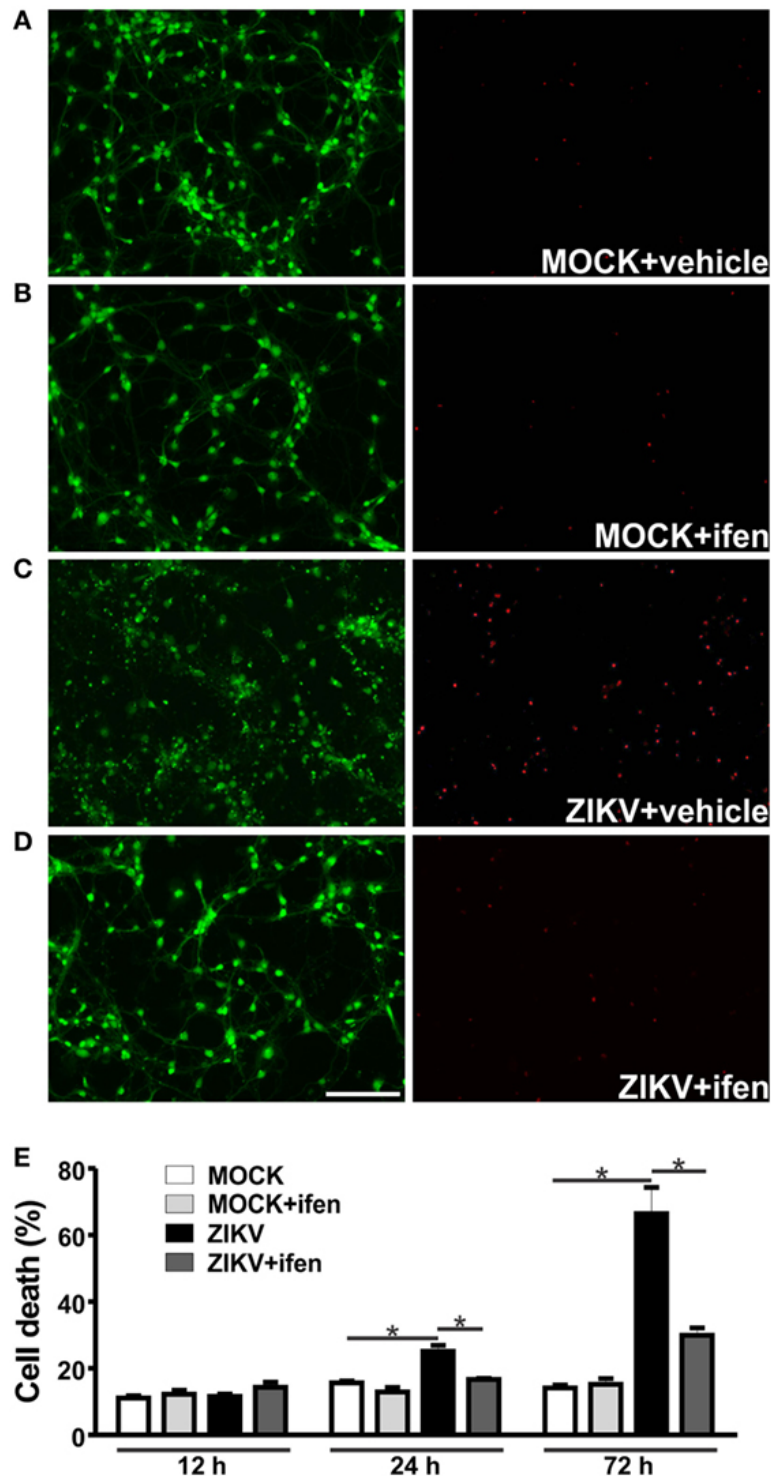


Figura 11. A inibição de GluR2B bloqueia a neurotoxicidade induzida pelo ZIKV. Micrografias representativas, obtidas em microscópio de fluorescência, de neurônios primários córtico-estriatais marcados com calceína AM (verdes, células vivas) e homodímero de etídio-1 (vermelho, células mortas) infectados com o ZIKV ou seu controle, submetidos ou não ao tratamento com o Ifenprodil (Ifen). Os grupos experimentais se subdividem em controle-infectado (MOCK) e não tratados (Vehicle) (A) ou tratados com 0,01 μ M de Ifenprodil (B), bem como os grupos infectados com o ZIKV e não tratados (C) ou tratados com 0,01 μ M de Ifenprodil (D). A barra de tamanho corresponde a 50 μ m em todas as imagens. (E) O gráfico mostra a porcentagem de morte celular neuronal dos grupos experimentais que não foram tratados ou tratados com ifenprodil 0,01 μ M por 12, 24 ou 72 h após infecção por MOCK ou ZIKV. Os dados representam as médias \pm SEM, n = 4. *indica diferenças significativas (p < 0,05).

Para verificar se a infecção pelo ZIKV nas culturas neuronais seria capaz de alterar os níveis de expressão das subunidades do NMDAR, foi avaliado os níveis de mRNA destas subunidades nos tempos de 12 e 24 horas após a infecção pelo vírus. Os receptores de NMDA são heterotetrâmeros, compostos por duas subunidades obrigatórias de GluN1 e duas subunidades adicionais de GluN2 e/ou GluN3 (Paoletti, Bellone et al. 2013). Os resultados não indicam alterações significativas na expressão relativa das subunidades GluN1 (Figura 12A), GluN2A (Figura 12B) e GluN3A (Figura 12D) nos tempos de 12 e 24 horas após a infecção, comparando grupos infectados e controle. Entretanto, as subunidades GluN2A (Figura 12B), GluN2B (Figura 12C) e GluN3A (Figura 12D) mostraram aumento significativo na expressão gênica nos grupos infectados com ZIKV 24 horas, quando comparados a 12 horas após a infecção. Além disto, a subunidade GluN2B mostrou aumento da expressão gênica nos tempos de 24 horas após a infecção, quando comparado aos grupos controle 24 horas e infectado com ZIKV 12 horas (Figura 12C). Em conjunto, estes dados revelam que o aumento da liberação de glutamato e da morte neuronal observada no tempo de 24 horas podem ser explicados, em parte, pelo aumento da expressão do NMDAR, contendo GluN2B, durante a infecção pelo ZIKV.

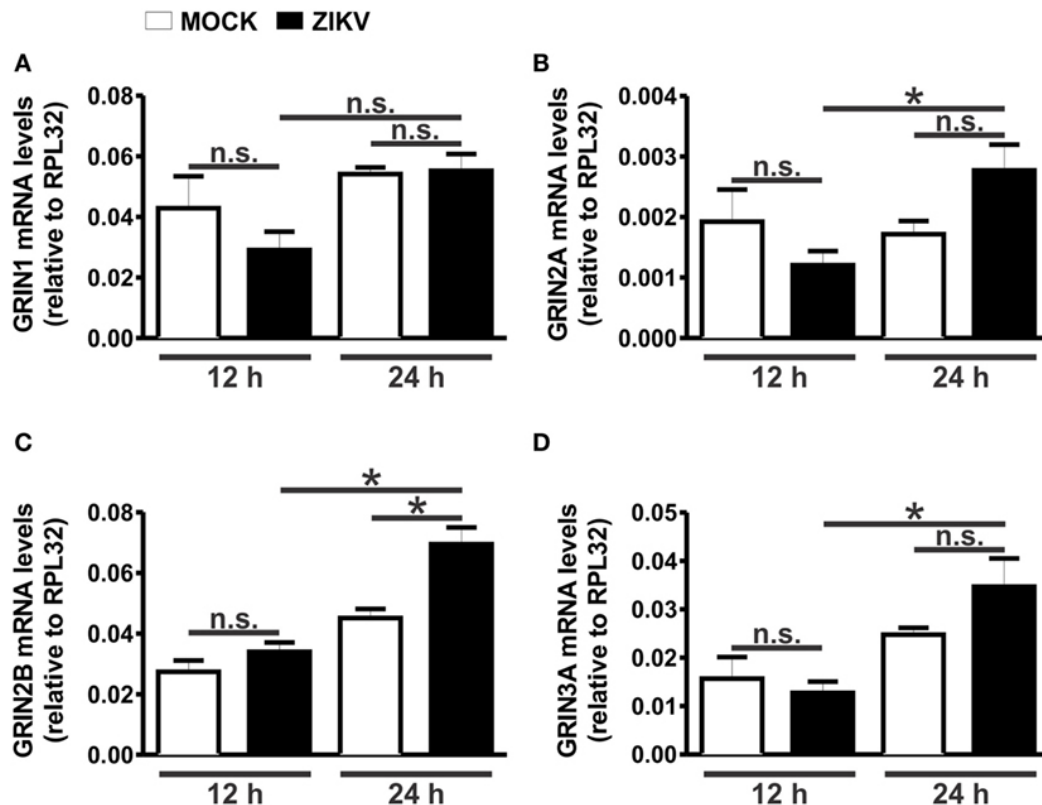


Figura 12. A infecção pelo ZIKV aumenta a expressão de GluN2. Os gráficos mostram os níveis de mRNA das subunidades do receptor NMDA, GluN1 (GRIN1) (A), GluN2A (GRIN2A) (B), GluN2B (GRIN2B) (C) e GluN3A (GRIN3A) (D) em amostras de neurônios córtico-estriatais em cultura primária nos tempos de 12 e 24 horas após infecção por ZIKV ou controle (MOCK). Os níveis de mRNA foram avaliados por RT-qPCR e normalizada para os níveis de mRNA de RPL32. Os dados representam as médias \pm SEM, n = 6. (n.s.) indica não significativo e (*) indica diferença significativa (p < 0,05).

Para compreender o mecanismo biológico neuroprotetor subjacente ao bloqueio de NMDAR contendo GluN2B, foi investigado quais seriam as possíveis vias de sinalização envolvidas na sobrevivência celular. Nossos dados mostram que o Ifenprodil reduziu os níveis aumentados de Ca^{2+} intracelular desencadeados pela infecção do ZIKV, o que poderia contribuir consideravelmente para a neuroproteção (Figura 9B). Além disso, hipotetizamos que as vias de ERK e CREB também poderiam contribuir para esse mecanismo neuroprotetor via Ifenprodil, já que a ativação destas vias desencadeia a transcrição de genes envolvidos na plasticidade sináptica e sobrevivência celular, envolvendo geralmente fatores neurotróficos (Almeida, Manadas et al. 2005, Hardingham and Bading 2010, Sakamoto, Karelina et al. 2011).

Estes eventos poderiam explicar a neuroproteção promovida pelo bloqueio de NMDAR contendo GluN2B, uma vez que as vias biológicas de ERK e CREB podem ser estimuladas por outros receptores de glutamato que não os NMDAR contendo GluN2B (Thomas and Huganir 2004). Como o Ifenprodil bloqueia somente os NMDARs contendo GluN2B, o glutamato extracelular ainda pode ativar NMDARs contendo GluN2A, que são NMDARs predominantemente sinápticos e promovem sobrevivência neuronal via sinalização de ERK, CREB e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Hardingham and Bading 2010).

Uma vez que as culturas neuronais infectadas pelo ZIKV exibiram altos níveis de glutamato extracelular (Figura 9A), investigamos se os níveis de fosforilação de ERK e CREB estariam alterados pelo tratamento com 0,01 μ M de Ifenprodil após a infecção pelo ZIKV. Nenhuma diferença foi observada ao comparar a ativação de ERK e CREB em culturas infectadas com ZIKV ou controles após 12 horas de infecção pelo vírus (Figuras 13A, 14A). No entanto, 24 horas após a infecção, a ativação de ERK foi aumentada em neurônios que foram infectados com ZIKV e tratados com Ifenprodil, em comparação com os neurônios controle (Figura 13B).

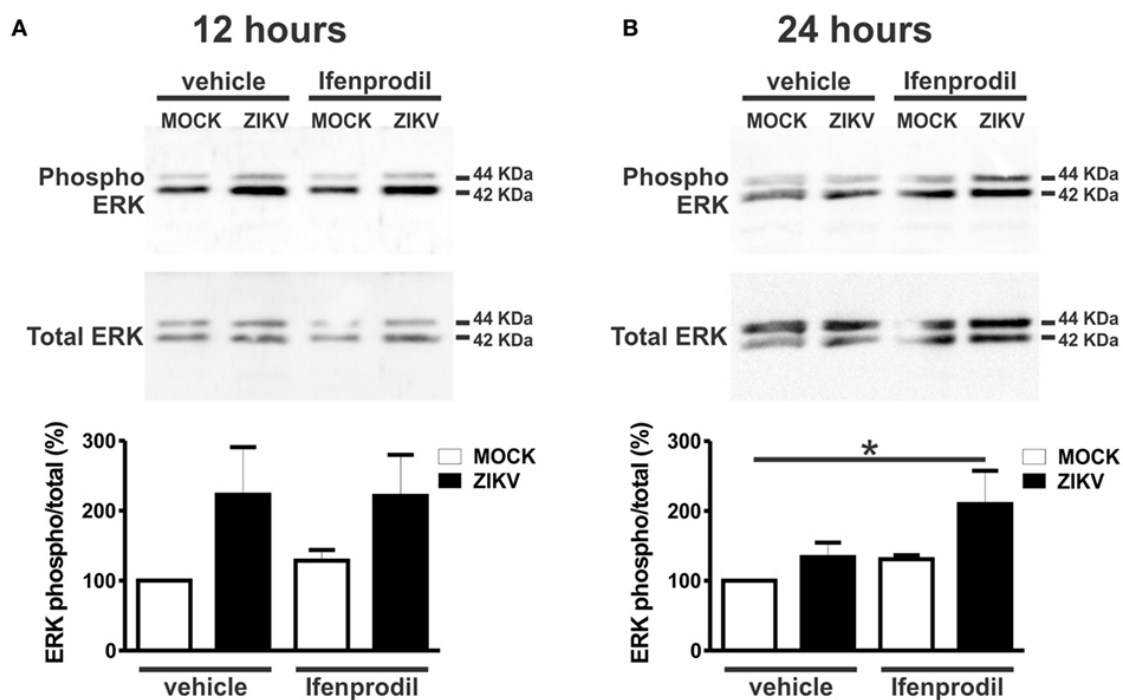


Figura 13. O tratamento com Ifenprodil em culturas infectadas pelo vírus Zika (ZIKV) leva ao aumento da fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK). No painel superior são mostradas imagens representativas de imunoblots para a expressão de p-ERK e, no painel inferior, são mostrados gráficos representando a análise densitométrica normalizada pela expressão total de ERK em neurônios córtico-estriatais em cultura primária que não foram tratados (veículo) ou que foram tratados com 0,01 μ M de ifenprodil durante 12 (A) ou 24 (B) horas após a infecção com ZIKV ou controle (MOCK). Foram utilizados 100 μ g de lisado celular para cada amostra. Os dados representam as médias \pm SEM, n = 5–6. * indica diferença significativa (p < 0,05).

A infecção por ZIKV, na presença ou ausência de tratamento com o Ifenprodil, aumentou a fosforilação de CREB, em comparação com os neurônios controle-infectados no tempo de 24 horas (Figura 14B). A fosforilação de CREB é um indicador da ativação desta proteína e, de maneira interessante, nós observamos também a ativação desta proteína mesmo no tratamento com ifenprodil e ausência do vírus (Figura 14B). Em conjunto, nossos dados mostram que a neuroproteção promovida pelas drogas inibidoras de NMDAR contendo GluN2B é justificada pela ativação de vias biológicas neuroprotetoras, tais como ERK e CREB. Portanto, estes resultados suportam a ideia de que o bloqueio de NMDAR pode oferecer uma estratégia terapêutica para prevenir a morte celular neuronal mediada pelo ZIKV.

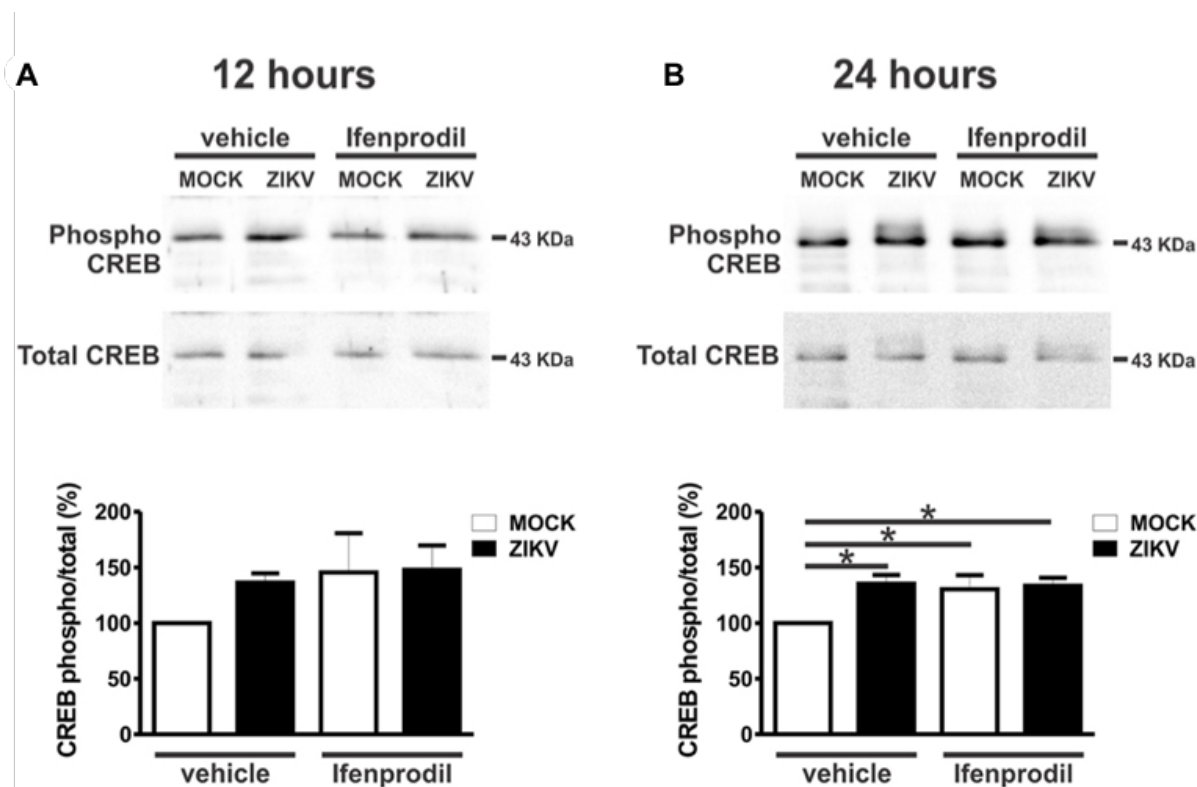


Figura 14. O tratamento com Ifenprodil leva ao aumento da fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB). No painel superior são mostradas imagens representativas de imunoblots para a expressão de p-CREB e, no painel inferior, são mostrados gráficos apresentando a análise densitométrica normalizada pela expressão total de CREB em neurônios córtico-estriatais em cultura primária que não foram tratados (veículo) ou que foram tratados com 0,01 μ M de ifenprodil durante 12 (A) ou 24 (B) horas após a infecção com ZIKV ou controle (MOCK). Foram utilizados 100 μ g de lisado celular para cada amostra. Os dados representam as médias \pm SEM, n = 4-6. (*) indica diferença significativa (p < 0,05).

4.4 Fatores pró-inflamatórios facilitam a excitotoxicidade induzida pelo ZIKV

Em injúrias do SNC, diversos elementos modulam a produção e a recaptação do glutamato. Dentre eles, o TNF- α pode aumentar a expressão da glutaminase, a enzima responsável pela reação de síntese do glutamato (Takeuchi, Jin et al. 2006, Chen, Ou et al. 2012). Além disso, tanto o TNF- α quanto a IL-1 β podem diminuir a recaptação do glutamato, aumentando assim os níveis extracelulares deste aminoácido (Szymocha, Akaoka et al. 2000, Prow and Irani 2008). As citocinas TNF- α e IL-1 β também podem sensibilizar os NMDARs, aumentando a entrada de Ca²⁺ intracelular e, portanto, a excitotoxicidade (Viviani, Bartesaghi

et al. 2003, Jara, Singh et al. 2007). Embora os mecanismos descritos demonstrem uma clara interação entre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e mecanismos celulares glutamatérgicos, a maioria dos estudos descrevem estes fenômenos em células da glia, tais como astrócitos ou micróglia. Até o presente momento, o nosso estudo tem elucidado mecanismos celulares desencadeados pelo ZIKV em culturas celulares fundamentalmente neuronais. Tendo em vista estes aspectos, hipotetizamos que os fenômenos descritos na literatura poderiam ocorrer em células alternativas às gliais, como os neurônios, por exemplo. Dessa forma, inicialmente, verificamos se os níveis de expressão de TNF- α e IL-1 β estariam aumentados diretamente em culturas primárias de neurônios infectadas pelo ZIKV. Em ensaio de RT-qPCR, os níveis de mRNA do TNF- α mostraram-se aumentados nos neurônios infectados com ZIKV, nos tempos de 12 e 24 horas, em comparação aos neurônios controle (Figura 15A). Os níveis proteicos do TNF- α também se mostraram elevados no sobrenadante das culturas infectadas com ZIKV por 24 e 48 horas, em comparação aos neurônios controle (Figura 15B).

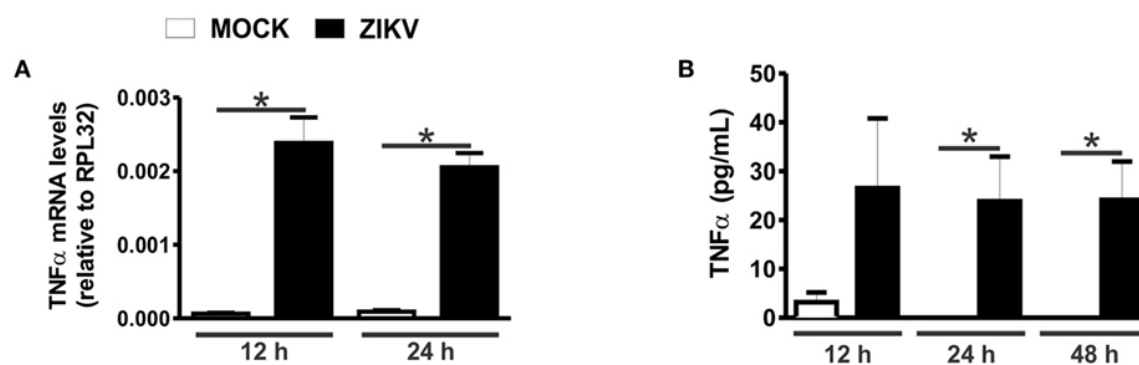


Figura 15. A infecção pelo ZIKV induz a expressão do fator de necrose tumoral α (TNF- α). Os gráficos mostram os níveis de expressão de mRNA (A) e proteína (B) de TNF- α em cultura primária de neurônios, 12 e 24 horas após a infecção pelo ZIKV ou controle (MOCK). Os níveis de mRNA foram avaliados por RT-qPCR, realizados em triplicata e normalizados para os níveis de mRNA de RPL32, e os níveis de proteína foram avaliados pelo teste de ELISA. Os dados representam as médias \pm SEM, n = 6–8. (*) indica diferenças significativas (p < 0,05).

Os níveis de mRNA da IL-1 β também se mostraram significativamente aumentados 12 horas após a infecção pelo ZIKV, quando comparado ao grupo controle (Figura 16). Contudo, não foi possível detectar os níveis proteicos de IL-1 β no sobrenadante das culturas de neurônios pelo método de ELISA.

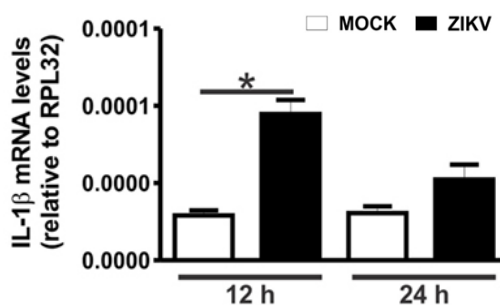


Figura 16. A infecção pelo ZIKV induz a transcrição da interleucina-1 β (IL-1 β). O gráfico mostra os níveis relativos do mRNA de IL-1 β em cultura primária de neurônios, 12 e 24 horas após a infecção pelo ZIKV ou controle (MOCK). Os níveis de mRNA foram avaliados por RT-qPCR, realizados em triplicata e normalizados pelos níveis de mRNA de RPL32. Os dados representam as médias \pm SEM, n = 6–8. (*) indica diferenças significativas ($p < 0,05$).

O aumento dos níveis de expressão de TNF- α e IL-1 β após a infecção pelo ZIKV sugere que estas citocinas podem contribuir na fisiopatologia da infecção do vírus. Sendo assim, para verificar se estas citocinas possuem um papel na neurodegeneração promovida pelo ZIKV, realizamos um ensaio de viabilidade celular em cultura de neurônios, bloqueando a atividade de TNF- α e do receptor de IL-1 β através das drogas Etanercept e IL-1RA, respectivamente. Etanercept é uma substância sintética que apresenta uma conformação capaz de sequestrar o TNF solúvel, inativando-o (Steed, Tansey et al. 2003). O IL-1RA (do inglês, “*interleukin-1 receptor antagonist*”) é um antagonista competitivo que se liga aos receptores de IL-1, inibindo a resposta celular pró-inflamatória (Seckinger, Lowenthal et al. 1987). O tratamento com Etanercept, nas concentrações testadas de 0,1; 1 e 10 μ g/mL, promoveu uma diminuição significativa da morte neuronal induzida pelo ZIKV quando comparado ao grupo infectado com o vírus e não tratado (Figura 17A). O bloqueio do receptor IL-1 β pela IL-1RA também

diminuiu significativamente a morte neuronal nas concentrações testadas (1, 10 e 100 ng/mL) (Figura 17B). Nossos dados também demonstram que não há diferença significativa entre os níveis de morte neuronal de culturas infectadas com ZIKV na presença de Etanercept (Figura 18A) ou IL-1RA (Figura 17B) quando comparado às culturas controle. Esses resultados confirmam a hipótese anterior de que citocinas pró-inflamatórias, expressas em neurônios, também contribuem para o mecanismo de morte celular desencadeado pelo ZIKV.

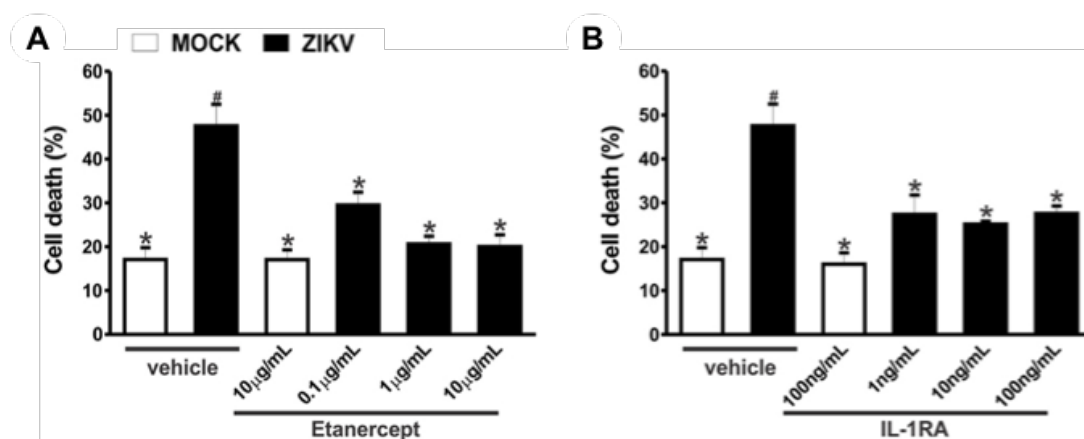


Figura 17. Citocinas pró-inflamatórias induzem a morte neuronal por um mecanismo induzido pela infecção do ZIKV. Os gráficos mostram a porcentagem de morte celular em cultura primária de neurônios não tratados (veículo) ou tratados com Etanercept 0,1, 1 ou 10 µg / mL (A) ou IL-1RA 1, 10 ou 100 ng/mL (B), 48 horas após a infecção pelo ZIKV ou controle (MOCK). Os dados representam as médias ± SEM, n = 4-5. (*) indica diferenças significativas em comparação com os neurônios infectados pelo ZIKV e (#) indica diferenças significativas em comparação aos neurônios infectados com MOCK (p <0,05).

Considerando a importância do TNF- α e da IL-1 β na neurotoxicidade induzida pelo ZIKV, foi investigado se estas citocinas contribuem para o aumento dos níveis de glutamato. Para isso, foi avaliado os níveis de expressão da glutaminase, bem como do transportador de glutamato (SLC1a) em neurônios infectados ou não com o ZIKV. Através do ensaio de RT-qPCR, não foi observada diferença significativa ao comparar culturas infectadas com ZIKV e controle, em termos dos níveis relativos do mRNA da glutaminase (Figura 18A). Por outro lado, os níveis de expressão de SLC1a estavam aumentados significativamente em culturas

neurônios 24 horas após a infecção pelo ZIKV, o que poderia constituir para um mecanismo de neuroproteção a fim de tamponar os aumentos dos níveis de glutamato extracelular decorrentes da infecção pelo vírus (Figura 18B).

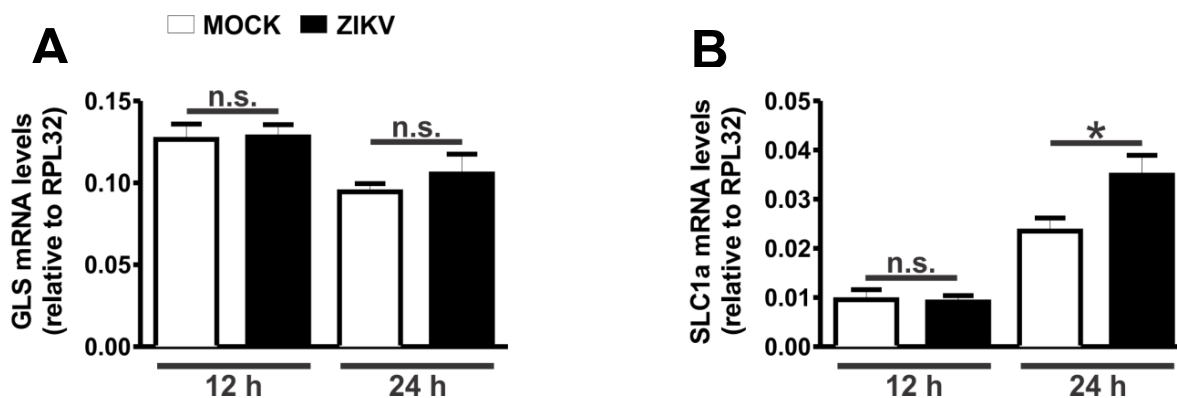


Figura 18. Níveis de expressão da glutaminase e transportador de glutamato após a infecção por ZIKV. Os gráficos mostram os níveis de mRNA da glutaminase (GLS) (A) e do transportador de glutamato (SLC1a) (B) em neurônios em cultura primária córtico-estriatais, 12 e 24 horas após a infecção pelo ZIKV ou controle (MOCK). Os níveis de mRNA foram avaliados por RT-qPCR, realizado em triplicata e normalizado para os níveis de mRNA do RPL32. Os dados representam as médias \pm SEM, $n = 6$. (n.s.) indica não significativo e (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$).

Para investigar se o TNF- α e a IL-1 β contribuem para o mecanismo de excitotoxicidade celular, avaliamos se estas citocinas poderiam estar facilitando a sensibilização do NMDAR. Para tal, a atividade de TNF- α e de IL-1 β foi bloqueada utilizando 1 μ g/mL de Etanercept ou 10 ng/mL de IL-1RA, respectivamente, com conseguinte mensuração dos níveis de Ca²⁺ intracelular. Confirmando a nossa hipótese, o bloqueio tanto de TNF- α quanto de IL-1 β diminuiu significativamente os níveis de Ca²⁺ intracelular, quando comparado aos neurônios infectados com ZIKV e não tratados (Figura 19). Esses dados sugerem que o aumento dos níveis de expressão de TNF- α e IL-1 β , desencadeada pelo ZIKV, foi capaz de sensibilizar os NMDARs, levando ao aumento da entrada do Ca²⁺ e, conseqüentemente, facilitando a excitotoxicidade.

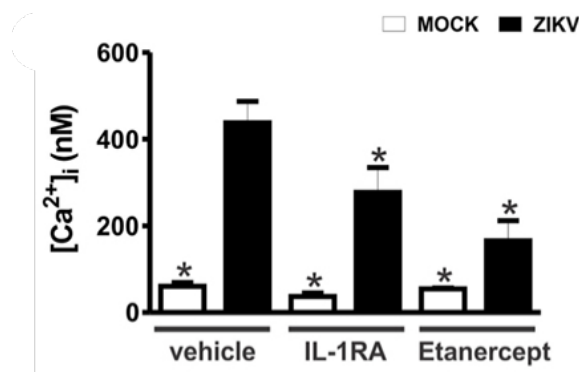


Figura 19. Citocinas pró-inflamatórias facilitam a excitotoxicidade decorrente da infecção pelo ZIKV. O gráfico mostra os níveis intracelulares de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) em cultura primária de neurônios não tratados (veículo) ou tratados com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Etanercept ou 10 ng/mL de IL-1RA, 48 horas após a infecção pelo ZIKV ou controle (MOCK). Os dados representam as médias \pm SEM, $n = 5-8$. (*) indica diferença significativa em comparação aos neurônios infectados pelo ZIKV ($p < 0,05$).

Os nossos resultados revelaram que, em culturas neuronais infectadas pelo ZIKV, pequenas alterações dos níveis de expressão de citocinas são capazes de conferir um fenótipo citotóxico para o neurônio. Desta maneira, nós decidimos investigar se estes fatores pró-inflamatórios produzidos pelos neurônios seriam capazes de ativar células da glia. Para isto, infectamos cultura primária mista de células da glia, com um meio condicionado (M.C.) proveniente de culturas neuronais infectadas com o ZIKV ou seu controle (Figura 20A). Nossos dados mostraram que, 24 horas após a infecção, o RNA viral foi detectado no grupo infectado com o M.C. contendo o ZIKV quando comparado ao grupo controle (Figura 20B). Entretanto não observamos diferença significativa entre o grupo infectado com o M.C. contendo o vírus quando comparado aos grupos MOCK e M.C. com o vírus inativado (Figura 20B). Embora os níveis de expressão do ZIKV tenham sido muito baixos, ao analisarmos as curvas de dissociação da reação de RT-qPCR, certificamos que os resultados do grupo infectado com o M.C., contendo o vírus, são específicos para o ZIKV (dados não mostrados). Analisamos também, por RT-qPCR, se os níveis de citocinas pró-inflamatórias, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, poderiam estar alteradas nas culturas de glia infectadas com o M.C. proveniente das células neuronais. Observamos que os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ estavam aumentados significativamente nos grupos infectados com o M.C. contendo o vírus e nas células gliais infectadas diretamente com

o ZIKV, quando comparado ao grupo controle (Figura 20C e D). Em contrapartida, os níveis de TNF- α e IL-1 β do grupo infectado com o M.C. inativado não apresentaram alterações significativas quando comparada ao grupo controle (Figura 20C e D). Os dados descritos indicam que os níveis de TNF- α e IL-1 β produzidos por neurônios não parecem ser suficientes para promover uma resposta inflamatória pelas células da glia, pelo menos com relação à produção de TNF- α e IL-1 β por essas células. Entretanto, outras estratégias experimentais poderiam ser implementadas visando uma investigação mais aprofundada sobre o efeito dos fatores celulares liberados por neurônios infectados pelo ZIKV e seus efeitos com relação à atividade de células da glia.

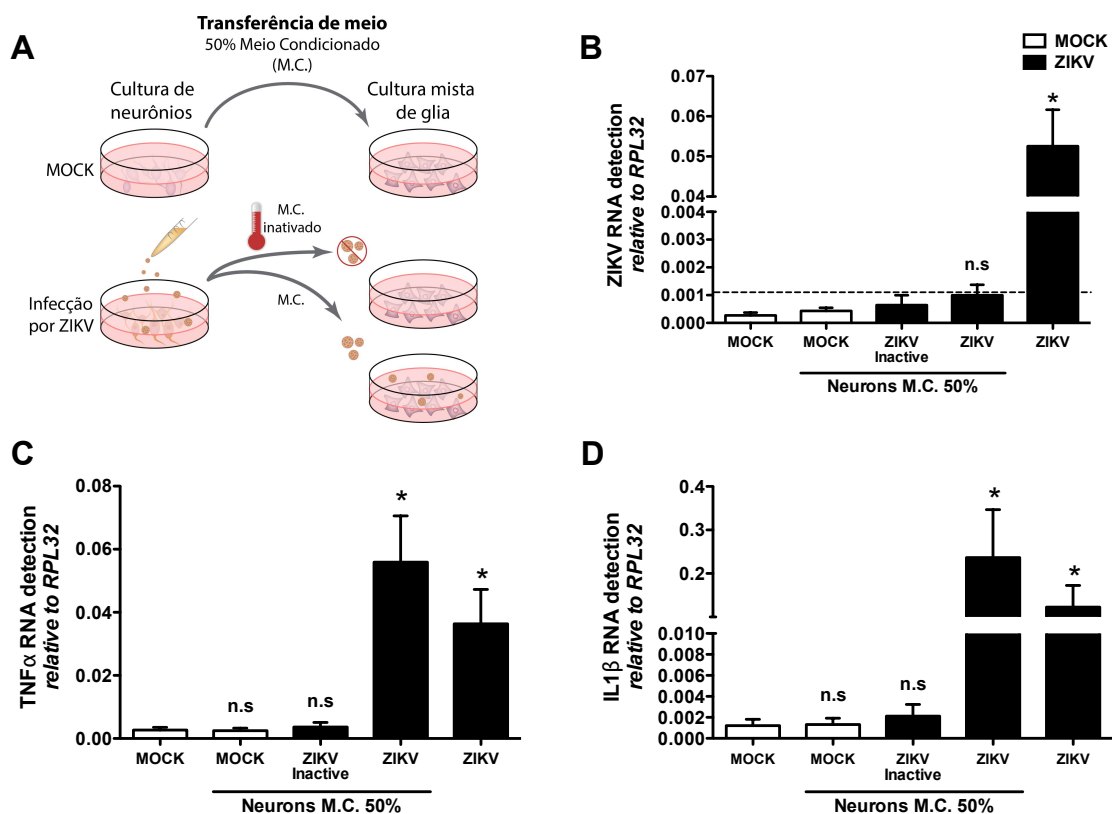


Figura 20. Efeito dos fatores extracelulares produzidos pelos neurônios infectados com o ZIKV em cultura primária mista de glia. Cultura primária mista de astrócito e microglia foi infectada tanto com o ZIKV e seu controle (MOCK), quanto com o meio condicionado (M.C.). (A) O esquema representa a preparação do M.C. adicionado a cultura mista de células gliais. Células primárias neuronais foram infectadas com o ZIKV e seu controle (MOCK) e o sobrenadante foi coletado 24 horas após a infecção. O M.C. foi preparado a partir de 50% de sobrenadante e adicionado a cultura primária de células da glia durante a infecção. Parte do sobrenadante infectado com o ZIKV foi aquecido a 94°C para inativação do vírus. Os níveis de RNA do ZIKV (B), do TNF- α (C) e do IL-1 β (D) foram avaliados por RT-qPCR, em triplicata biológica e normalizada pelo gene de referência RPL32. Os dados representam as médias \pm SEM, n = 4. (*) indicam diferenças significativas comparadas ao grupo MOCK ($p < 0,05$). (n.s.) indicam diferenças não significativas comparadas ao grupo MOCK ($p > 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1 O ZIKV induz a apoptose neuronal de maneira não-autônoma

Estudos apontam que células infectadas por vírus podem sofrer apoptose como uma resposta protetora, limitando assim a replicação viral (Gavrieli, Sherman et al. 1992, Ankarcona, Dypbukt et al. 1995, Elmore 2007). Este fenômeno pode ocorrer de forma não-autônoma, em resposta a estímulos externos, ou de maneira autônoma, em resposta a anormalidades da própria célula (Gavrieli, Sherman et al. 1992, Elmore 2007). As vias de apoptose extrínseca e intrínseca convergem para clivar a procaspase-3 em caspase 3, que regulam diversos substratos celulares promovendo alterações morfológicas associadas à morte celular, como condensação da cromatina, encolhimento celular, formação de bolhas nucleares e de membrana plasmática (Elmore 2007). Os Flavivírus podem induzir o dano no tecido neuronal alterando a expressão de proteínas pró-apoptóticas e, assim, promover a morte das células infectadas (Liao, Lin et al. 1997, Parquet, Kumatori et al. 2001, Su, Liao et al. 2002, Tang, Hammack et al. 2016). Na infecção pelo WNV, foi demonstrado que 96% dos neurônios corticais primários infectados pelo vírus também são caspase 3 positivos (Shrestha, Gottlieb et al. 2003). De maneira interessante, em nosso estudo observamos que a maioria dos neurônios positivos para a caspase 3 foi negativa para o ZIKV, indicando que a resposta celular desencadeada pelo vírus ocorreu de maneira não-autônoma. Estudos anteriores demonstraram que o ZIKV induz a apoptose de NPCs humanas, entretanto a correlação do número de células positivas para caspase 3 e ZIKV não foi determinada (Cugola, Fernandes et al. 2016, Garcez, Loiola et al. 2016, Xu, Lee et al. 2016). Resultados semelhantes foram encontrados em modelo murino, no qual embriões e camundongos jovens, quando submetidos à injeção intracraniana de ZIKV, apresentaram o tecido cerebral contendo células positivas para caspase 3 e ZIKV (Cugola, Fernandes et al. 2016, Huang, Abraham et al. 2016). De maneira interessante, um

estudo recente aponta que NPCs infectadas com ZIKV também são positivas para caspase 3, ao contrário de nossos dados que sugere um mecanismo não autônomo de apoptose celular (Tang, Hammack et al. 2016). Acreditamos que os tempos após a infecção que foram analisados são o principal fator para encontrarmos resultados diferentes pois, no referido estudo, a apoptose celular induzida pelo vírus foi quantificada 72 horas após a infecção pelo ZIKV, tempo no qual a infecção é massiva e possivelmente atingiu a saturação do crescimento viral (Figura 6A) (Tang, Hammack et al. 2016). Entretanto, em nosso estudo, nós realizamos a maior parte das análises entre 12 e 48 horas após a infecção, com o objetivo de investigar quais elementos iniciariam a neurodegeneração induzida pelo ZIKV. Em tempos superiores a estes, observamos morte celular de aproximadamente 70% nas culturas neuronais infectadas com o vírus (Figura 7A), o que dificultaria as nossas análises. Com este conjunto de dados, entendemos que o ZIKV é capaz de se replicar em neurônios e aqueles neurônios não infectados sofrerão apoptose, exacerbando a neurodegeneração (Figura 21A).

O mecanismo de indução da apoptose desencadeado nas células adjacentes às infectadas deve-se possivelmente à liberação de glutamato e de citocinas, incluindo TNF- α e IL-1 β , mediadas pela infecção pelo ZIKV. Dentre as citocinas, o TNF- α circulante pode induzir uma resposta apoptótica a partir da ativação de seus receptores (TNFR) contendo o domínio de morte (DD, do inglês – “*death domain*”). Após a ligação do TNF- α ao seu receptor, os TNFRs recrutam moléculas adaptadoras distintas no domínio DD, ativando três vias principais de sinalização: sinalização NF- κ B, sinalização MAPK/C-Jun e sinalização caspase/apoptótica (Gaur and Aggarwal 2003). Estudos anteriores mostraram que os níveis de expressão do TNF- α aumentam após infecções virais e este fenômeno pode desencadear a sinalização caspase/apoptótica em células neuronais (Nuovo, Gallery et al. 1994, Talley, Dewhurst et al. 1995, Alvarez, Blanco et al. 2011, Shao, Herrlinger et al. 2016). Em encéfalos de pacientes acometidos pela encefalite originada do vírus da imunodeficiência adquirida – tipo 1 (HIV-1),

foi detectado altos níveis de mRNA de TNF- α em comparação as amostras de indivíduos controle (Nuovo, Gallery et al. 1994). Estudos seguintes demonstraram que há um aumento significativo de neurônios com núcleos apoptóticos próximos a infiltrados de macrófagos perivasculares infectados com HIV-1 de pacientes quando comparado a indivíduos controle (James, Sharer et al. 1999). Além disto, a partir de ensaios *in vitro* utilizando meio condicionado de células infectadas, foi estabelecido uma correlação entre o aumento dos níveis de TNF- α e a apoptose mediada pela ativação de caspase 3 após a infecção pelo HIV-1, confirmando o efeito extrínseco da citocina na morte celular de células vizinhas (Talley, Dewhurst et al. 1995). Em nossos dados, identificamos um aumento significativo dos níveis proteicos de TNF- α no meio celular das culturas neuronais infectadas com o ZIKV (Figura 16B), bem como uma redução da morte neuronal mediante a sua inibição pelo Etanercept após infecção pelo ZIKV (Figura 18A), confirmando assim a atividade pró-apoptótica do TNF- α circulante mediado pela infecção viral. Entretanto, para confirmar a atividade extrínseca do TNF- α induzida pela infecção do ZIKV seriam necessários ensaios de imunofluorescência que demonstrassem a presença do vírus em neurônios apresentando produção aumentada desta citocina.

Identificamos também uma diminuição significativa da neurodegeneração nas culturas neuronais infectadas com o ZIKV e tratadas com o inibidor de IL-1 β , IL-1RA (Figura 18B). Embora não fosse possível detectarmos o IL-1 β no sobrenadante celular, possivelmente, mesmo os baixos níveis de sua expressão contribuíram para a morte neuronal mediada pela infecção pelo ZIKV. Infecções virais desencadeiam respostas imunes inatas em células do hospedeiro e a produção e liberação de IL-1 β tem sido associada não somente a infecções em células imunes do SNC, mas também em neurônios (Irani and Prow 2007, Kaushal, Dye et al. 2015, Wang, Li et al. 2018). Em monócitos, macrófagos e micróglia induzidas, este processo é regulado pelo complexo sensor citoplasmático denominado inflamassoma (Scheiblich,

Schlutter et al. 2017, Wang, Li et al. 2018). O mecanismo envolve a oligomerização de um complexo proteico contendo receptores NOD do tipo 3 (NLRP3), promovendo a clivagem da pró-caspase do tipo 1 (Casp-1), que regula a maturação da IL-1 β (Schroder and Tschopp 2010, Scheiblich, Schlutter et al. 2017). Estudos recentes apontam que infecções pelo ZIKV ativam a produção e liberação de IL-1 β em soro de pacientes infectados e no sobrenadante de células em cultivo (Lum, Low et al. 2017, Wang, Li et al. 2018). Foi observado em monócitos e macrófagos infectados com o ZIKV que a proteína NS5 do vírus facilita a montagem e ativação do inflamassoma contendo o NLRP3, regulando assim o aumento dos níveis de IL-1 β ativa (Wang, Li et al. 2018). Embora estes estudos tenham sido realizados em células imunes circulantes, foi observado em ensaios *in vitro* e *in vivo* que células neuronais também apresentam a ativação do inflamassoma mediado pelo NLRP do tipo 1 (NLRP1), após estimulação por lipopolissacarídeo, resultando em um aumento dos níveis de IL-1 β ativa (Kaushal, Dye et al. 2015). Em nosso trabalho, não foi possível detectar um aumento do IL-1 β no sobrenadante de células após a infecção pelo vírus nas culturas primárias neuronais, entretanto observamos que o tratamento pelo IL-RA foi capaz de reduzir a morte neuronal induzida pela infecção, o que indica que baixos níveis desta citocina são capazes de gerar um fenótipo deletério para a célula. Um possível mecanismo celular que justificaria o aumento dos níveis de IL-1 β pode ser explicado pela formação de inflamassoma contendo o NLRP1 nas células infectadas pelo vírus (Figura 21B). Para testar esta hipótese, culturas neuronais poderiam ser submetidas ao silenciamento da expressão de NLRP1 por RNAi e, em seguida, realizar-se-ia o ensaio de viabilidade celular para confirmar se a inibição do inflamassoma é capaz de resgatar a sobrevivência neuronal após a infecção pelo ZIKV. A formação de inflamassomas contendo o NLRP3 também poderia justificar o aumento significativo das citocinas pro-inflamatórias em culturas mistas de glia infectadas com o ZIKV, entretanto estes resultados ainda são incipientes. Desta forma, faz-se necessário mais experimentos a fim de

confirmar os níveis proteicos da IL-1 β , bem como avaliar se o silenciamento de NLRP3, bem como de Casp-1 são capazes de diminuir os níveis de IL-1 β circulantes após a infecção pelo ZIKV.

Embora o ZIKV promova uma extensa morte celular em culturas primárias neuronais, ainda não está claro por que as células infectadas pelo vírus são poupadas da apoptose. Em análise de transcriptoma, foi demonstrado que neuroesferas originadas de NPCs humanos infectadas pelo ZIKV apresentam uma expressão aumentada do fator anti-apoptótico PRPF8 (Figura 21B) (Garcez, Nascimento et al. 2017). Esta proteína é capaz de interferir no processamento de mRNA e promover um efeito anti-apoptótico em neurônios através da expressão de genes envolvidos na regulação da expressão gênica e sobrevivência celular (Keightley, Crowhurst et al. 2013, Garcez, Nascimento et al. 2017). Alguns vírus da família Picornavirus alteram a atividade do fator PRPF8 da célula hospedeira, interferindo na sinalização apoptótica e permitindo a replicação viral na célula hospedeira (Liu, Kuo et al. 2014). Ademais, estudos recentes revelaram que alguns Flavivirus, tais como WNV, DENV e JEV, podem induzir uma sinalização antiapoptótica após a infecção. Foi observado em ensaios *in vitro* que a atividade antiapoptótica está relacionada ao capsídeo viral desencadeando a fosforilação de Akt, dependente da via de PI-3K (Figura 21B) (Lee, Liao et al. 2005, Urbanowski and Hobman 2013). Corroborando a hipótese de que determinados vírus seriam capazes de ativar vias neuroprotetoras, nossos resultados demonstraram que culturas neuronais infectadas com o ZIKV apresentam níveis elevados de fosfo CREB. Assim, seria interessante avaliar se os neurônios positivos para ZIKV apresentariam maior ativação de CREB. Desta forma, estudos futuros serão necessários para investigar quais são os mecanismos celulares antiapoptóticos que poderiam justificar a sobrevivência de neurônios infectados com o ZIKV, em detrimento dos neurônios não infectados.

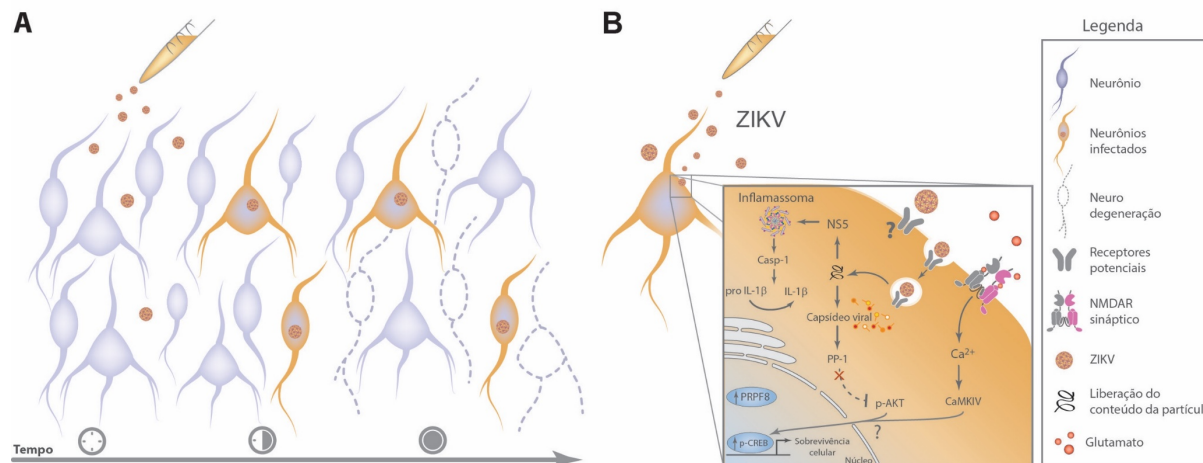


Figura 21. O ZIKV promove a morte de células neuronais de maneira não autônoma. (A) O esquema representa o perfil de morte neuronal induzida pelo vírus. O ZIKV pode ser detectado em células neuronais primárias, 12 horas após a infecção viral. 24 horas depois, a lesão celular pode ser observada apenas em neurônios não infectados próximos a células infectadas, indicando que os neurônios infectados possivelmente liberam fatores citotóxicos aos não infectados. **(B)** O esquema representa as sinalizações celulares potenciais que poderiam explicar a sobrevivência e liberação de citocinas pelos neurônios infectados. O ZIKV é endocitado mediante receptores de superfície (ver Figura 3B) e o conteúdo da partícula viral é liberado e traduzido em diversas proteínas próprias, dentre elas o capsídeo. O capsídeo viral sequestra e inibe a atividade da enzima fosfatase tipo PP-1, aumentando os níveis da proteína quinase B fosforilada (p-Akt). A p-Akt ativa a proteína de ligação ao elemento de resposta ao c-AMP (CREB), responsável pela transcrição de diversos genes associados a sobrevivência celular. Além deste mecanismo, a estimulação de receptores de NMDA (NMDAR) também ativam uma sinalização alternativa que leva ao aumento de fosforilação da CREB e, conseqüentemente, aumento da sobrevivência celular. Com o aumento da liberação do glutamato, os NMDAR são ativados e aumentam o influxo de Ca^{2+} . Os íons Ca^{2+} intracelulares rapidamente ativam a proteína quinase dependente de Ca/Calmodulina tipo IV (CaMKIV) que, conseqüentemente, aumenta a atividade nuclear de p-CREB. Neurônios infectados possivelmente liberam IL-1 β para o meio extracelular devido a ativação de inflamassoma. O mecanismo envolve a interação da proteína não-estrutural do NS5 a domínios específicos da proteína NLRP1 auxiliando, assim a formação do complexo sensor citoplasmático denominado inflamassoma. Por conseqüente, o inflamassoma promove a clivagem da pró caspase do tipo 1 (Casp-1), que irá conseqüentemente estimular a formação do IL-1 β a partir da pro IL-1 β .

5.2 Mecanismos de sobrevivência celular e neurodegeneração mediados pelo NMDAR e o ZIKV

Nossos resultados demonstram que o bloqueio de NMDARs contendo GluN2B leva à neuroproteção contra a infecção pelo ZIKV. Considerando que em injúrias do SNC os NMDARs extra-sinápticos são mais comumente ativados pela exposição crônica ao glutamato (Hardingham, Fukunaga et al. 2002), nós observamos que a infecção por ZIKV levou ao aumento sustentado dos níveis de glutamato na cultura, que por analogia poderia ocasionar na ativação de NMDARs extra-sinápticos. Corroborando essa hipótese, o Ifenprodil reduziu

significativamente os níveis intracelulares de Ca^{2+} e resgatou a morte celular neuronal induzida pelo ZIKV. O influxo de Ca^{2+} desencadeia a sinalização de diversas vias celulares que podem estar relacionadas à atividade sináptica fisiológica ou a sinalizações citotóxicas. Estudos apontam que o aumento dos níveis de Ca^{2+} , induzido pela ativação do NMDARs extrasinápticos, pode desencadear uma via de inibição do CREB, bem como a disfunção do potencial de membrana mitocondrial, levando à morte neuronal (Hardingham, Fukunaga et al. 2002). Por outro lado, o influxo de Ca^{2+} evocado pela ativação do NMDAR sináptico pode desencadear a ativação do CREB, que aumenta a expressão de genes importantes para a sobrevivência neuronal, incluindo o BDNF, além de genes importantes para reduzir a apoptose, tornando as mitocôndrias mais resistentes ao estresse celular e a insultos tóxicos (Bading, Ginty et al. 1993, Hardingham, Fukunaga et al. 2002, Vanhoutte and Bading 2003, Zhang, Steijaert et al. 2007).

Considerando a neuroproteção promovida pelo Ifenprodil, parte do mecanismo celular envolvido neste processo poderia ser explicado pela ativação de CREB via ERK. Em cultura primária de neurônios corticais e hipocâmpais foi observado que a estimulação de NMDARs sinápticos promovem a fosforilação sustentada de ERK mediada pela ativação das vias de Ca^{2+} /calmodulina e PI-3K (Chandler, Sutton et al. 2001, Kim, Dunah et al. 2005). A ativação da ERK, dependente de NMDAR, também envolve a família de proteínas GTPase Ras (Kim, Dunah et al. 2005). As GTPases da família Ras são proteínas G pequenas, importantes em cascatas de sinalização intracelular e podem ser inibidas por proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) (Thomas and Huganir 2004). Foi observado por exemplo que NMDARs, contendo GluN2B, ligam-se a proteína SynGAP que pode desencadear a inativação de Ras e, conseqüentemente, resultar na inibição de ERK (Kim, Dunah et al. 2005). Dentro desta perspectiva, em nosso trabalho observamos níveis elevados de glutamato e não observamos ativação de ERK em culturas infectadas com ZIKV (Figuras 9 e 13B). Entretanto, encontramos

um aumento significativo da ativação de ERK quando o Ifenprodil foi adicionado a culturas infectadas (Figura 13B). Portanto, é possível que o bloqueio de NMDAR contendo GluN2B tenha diminuído a inativação de ERK, permitindo a ativação de seus alvos, incluindo CREB (Figura 22B).

Em paralelo a estes resultados, observamos também um aumento significativo de p-CREB em culturas infectadas pelo ZIKV, não tratadas com Ifenprodil. Isto se deve, provavelmente, ao fato de o CREB poder ser ativado por mecanismos alternativos a via de ERK. Por exemplo, foi demonstrado que a estimulação sináptica de NMDAR pode levar à ativação da CaMKIV, que promove a ativação rápida de CREB, em oposição aos efeitos de ação mais lenta e duradouras produzidos por ERK (Figura 4A) (Wu, Deisseroth et al. 2001, Thomas and Huganir 2004). Além disto, a própria atividade viral pode alterar vias biológicas próprias das células neuronais. Os Flavivírus são conhecidos por regular a apoptose da célula hospedeira por um mecanismo dependente da ativação de Akt (Lee, Liao et al. 2005). Estudos recentes apontam que parte desse fenômeno se deve a interação do capsídeo viral e fosfatases provenientes do hospedeiro, sendo observado que o capsídeo viral é capaz de sequestrar a fosfatase PP-1, que desfosforila a Akt, resultando em níveis intracelulares mais altos de Akt fosforilada (Airo, Urbanowski et al. 2018). Sendo a fosforilação de Akt importante para ativar a via de CREB, acreditamos que o aumento da p-CREB, observada nas culturas infectadas pelo ZIKV, também poderia ser justificada por um possível aumento da ativação de Akt (Figura 21B) (Du and Montminy 1998). Portanto, os resultados aqui apresentados corroboram estudos anteriores e indicam que a presença do ZIKV pode não necessariamente levar à morte celular mediada por NMDAR, desde que os NMDARs contendo GluN2B sejam bloqueados.

5.3 Indução da expressão de TNF- α e IL-1 β por neurônios infectados com o ZIKV

A maioria dos vírus que apresentam neurotropismo induzem a produção de fatores inflamatórios pelas células da glia. Por exemplo, o JEV pode infectar células neuronais e gliais, promovendo a liberação de fatores inflamatórios, incluindo TNF α e IL-1 β , além de glutamato por células microgliais (Chen, Ou et al. 2012). O ZIKV também é capaz de infectar microglias humanas cultivadas *in vitro*, desencadeando uma resposta inflamatória com o aumento dos níveis de IL-6, TNF- α , IL-1 β e proteína quimiotática de monócitos 1 (Lum, Low et al. 2017). Resultados semelhantes foram obtidos em cultivos de microglias primária derivadas de camundongos E14 em que a infecção pelo ZIKV induziu o aumento dos níveis de TNF- α , IL-6, IL-1 β e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Wang, Liu et al. 2018). Neste mesmo estudo, o meio condicionado da microglia infectada pelo ZIKV foi capaz de inibir a diferenciação neuronal de NPCs murinos (Wang, Liu et al. 2018). Estes resultados sugerem que a indução de fatores pró-inflamatórios desempenha um papel importante na neuropatogênese desencadeada pelo ZIKV. Embora a microglia seja o tipo celular que está predominantemente relacionado a respostas inflamatórias no SNC, em certas situações específicas, os neurônios também podem aumentar a produção de citocinas (Liu, Clark et al. 1994). O WNV também induz a expressão de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α por células neuronais e essas citocinas, quando derivadas de neurônios, podem mediar a ativação de astrócitos e contribuir para a neurotoxicidade induzida pelo vírus (Kumar, Verma et al. 2010). Em nossos resultados, o aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β representou um papel importante na morte neuronal induzida pelo vírus. Embora o ZIKV tenha elevado os níveis de TNF- α e, em menor escala, de IL-1 β nas culturas neuronais, esse aumento foi suficiente para sensibilizar os NMDARs, aumentando os níveis de Ca²⁺ intracelulares e facilitando a morte neuronal (Figura 22A). Diante destes dados, é possível que a infecção pelo ZIKV possa ativar a produção

neuronal de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$. Também devemos considerar que a microglia presente em nossas culturas neuronais podem ter contribuído para a produção dessas citocinas. No entanto, talvez essa hipótese não seja plausível, já que o número de microglia era muito pequeno ($\sim 0,5\%$) e não foi aumentado devido à infecção pelo ZIKV. Estudos futuros serão importantes para determinar o papel de diferentes tipos de células cerebrais na neuroinflamação induzida pelo ZIKV.

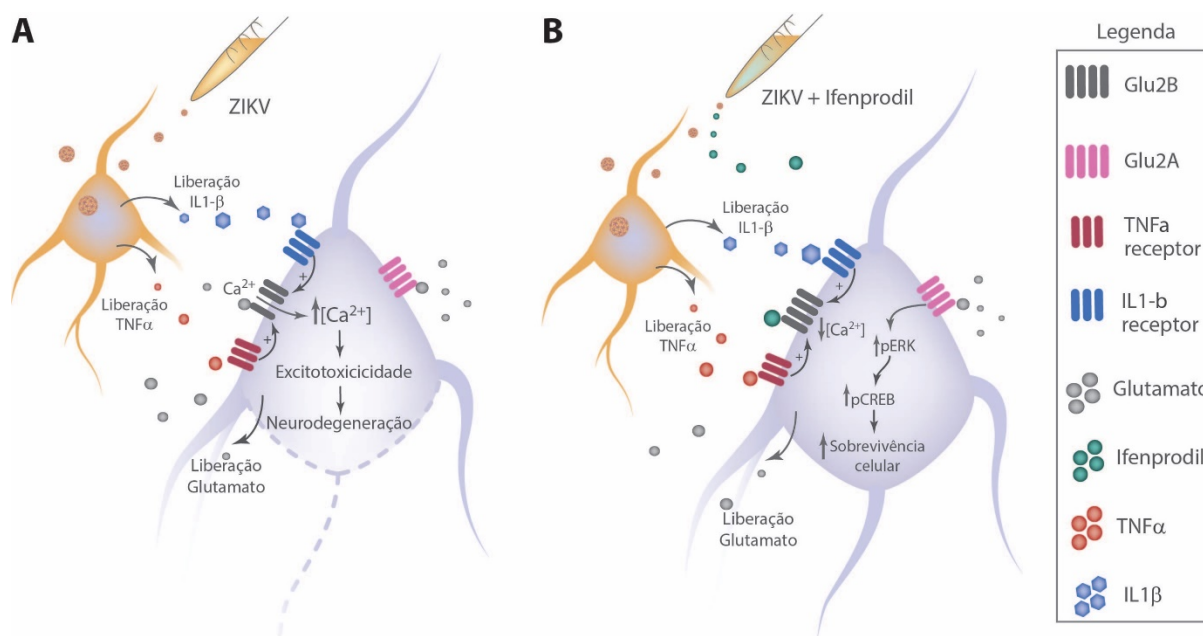


Figura 22. O ZIKV desencadeia a liberação de fatores neurotóxicos promovendo a neurodegeneração via ativação de NMDAR contendo a subunidade GluN2B. (A) O esquema representa culturas neuronais infectadas com o ZIKV, as quais liberam glutamato e citocinas pró-inflamatórias, o que desencadeia a sensibilização do receptor N-metil-d-aspartato (NMDAR) contendo a subunidade GluN2B e aumenta o influxo de Ca^{2+} intracelular, facilitando a excitotoxicidade. (B) O tratamento com Ifenprodil em culturas infectadas pelo ZIKV reduz o fluxo aumentado de Ca^{2+} mediado pela atividade de NMDAR contendo GluN2B. A ativação de NMDARs contendo GluN2A na presença de ifenprodil leva à ativação de ERK e CREB, o que pode aumentar a expressão de genes importantes para a sobrevivência neuronal.

5.4 As citocinas TNF- α e IL- β sensibilizam os NMDARs e desencadeiam a morte neuronal

Células cerebrais sujeitas a alguma injúria liberam altos níveis de glutamato, o que poderia justificar, em parte, a propagação da morte das células adjacentes, de maneira não-autônoma (Lipton and Rosenberg 1994, Darman, Backovic et al. 2004). Em nosso trabalho, observamos que os níveis de expressão de GluN2B estão aumentados em culturas infectadas com ZIKV. Embora, ainda não esteja claro porque a expressão desta subunidade é aumentada após a infecção viral, alguns estudos relacionam a regulação dos níveis de expressão das subunidades de NMDAR à atividade de citocinas pró-inflamatórias. Foi demonstrado, por exemplo, que o aumento dos níveis de TNF- α correlaciona-se com o aumento da expressão de GluN1, assim como o aumento de IL-1 β promove o aumento da expressão de GluN2A/B (Weaver-Mikaere, Gunn et al. 2013, Dong, Kalueff et al. 2017). Dessa forma, é possível que o aumento dos níveis de IL-1 β observado em culturas neuronais infectadas com o ZIKV tenha alguma relação com o aumento da expressão dos níveis de mRNA de GluN2B. Entretanto, ainda não está claro qual é o mecanismo que contribui para o aumento da expressão de GluN2B mediado pela infecção do ZIKV em neurônios.

Além do aumento dos níveis de glutamato, os nossos resultados mostram que as citocinas TNF- α e IL-1 β também estão envolvidas na morte neuronal induzida pelo ZIKV. Foi demonstrado previamente que estas citocinas pró-inflamatórias potencializam a excitotoxicidade através de interações funcionais com os NMDARs (Floden, Li et al. 2005, Fogal and Hewett 2008, Olmos and Llado 2014). Por exemplo, a IL-1 β pode sensibilizar os NMDARs através da fosforilação das subunidades GluN2A/B pela tirosina quinase Src, aumentando o influxo de Ca²⁺ nos neurônios (Viviani, Bartesaghi et al. 2003). O TNF- α também pode sensibilizar os NMDARs, aumentando a entrada de Ca²⁺ dependente de NMDAR e facilitando a neurotoxicidade (Jara, Singh et al. 2007). Além disso, também já foi

demonstrado que o TNF- α pode aumentar a localização de receptores de glutamato ionotrópico, incluindo NMDAR, nos sítios sinápticos (Pickering, Cumiskey et al. 2005). Neste trabalho, nós identificamos que a infecção pelo ZIKV aumentou os níveis de expressão de IL-1 β e TNF- α e o bloqueio dessas citocinas tanto diminuiu o influxo de Ca²⁺ quanto a morte neuronal. Estes resultados indicam que a IL-1 β e o TNF- α sensibilizam os NMDARs, facilitando a excitotoxicidade induzida pelo ZIKV.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A epidemia de ZIKV representou uma nova ameaça à saúde global, com particular relevância para os neurocientistas, devido às síndromes congênitas associada ao recém-nascido e aos distúrbios neurológicos associados aos adultos. Dessa maneira, faz-se necessário o contínuo investimento em pesquisa científica relacionada a busca de novos tratamentos e da compreensão da patogênese associada ao ZIKV. Neste trabalho, desvendamos um pouco mais os mecanismos de neurodegeneração associados ao vírus, bem como o mecanismo celular de neuroproteção associado ao bloqueio de receptores do tipo NMDA. Os nossos resultados revelaram que o ZIKV induz a morte neuronal em um mecanismo não-autônomo. Parte desta neurodegeneração pode ser justificada pelo aumento da liberação de glutamato e de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-1 β . Estes fatores ativam os NMDARs, promovendo excitotoxicidade e, conseqüentemente, morte celular neuronal. Além disto, o bloqueio dos NMDARs, contendo GluN2B, foi capaz de reduzir a morte neuronal através da diminuição dos níveis intracelulares de Ca²⁺ e do aumento da ativação de vias biológicas envolvidas na sobrevivência celular, incluindo a via de ERK e CREB. Embora estes resultados ajudem a dar mais um passo rumo ao entendimento dos mecanismos neurotóxicos provocados pela infecção por ZIKV, muitas perguntas ainda permanecem abertas. Por exemplo, ainda não está claro quais mecanismos celulares estão envolvidos na sobrevivência de células infectadas pelo vírus em detrimento das células não infectadas. Além disto, ainda não se sabe quais os fatores biológicos que alteram a expressão da subunidade GluN2B em células infectadas pelo ZIKV. Sob outra perspectiva, qual seria o papel de outros tipos celulares do SNC, no início da morte neuronal, desencadeada pela infecção pelo vírus? Sem dúvida, estudos nesta área poderiam auxiliar a compreender melhor a patogênese da infecção pelo ZIKV e o que diferencia este dos demais Flavivírus com atividade neurotrópica. Além do olhar biológico frente ao vírus, estes

estudos poderiam lançar novas perspectivas de tratamento para a infecção pelo ZIKV, principalmente para pacientes que incorram em risco de complicações, como gestantes durante os primeiros estágios da gravidez.

7. BIBLIOGRAFIA

7.1 Bibliografias não indexadas (folhetins de órgãos de saúde mundiais)

Pan American Health Organization/World Health Organization. Epidemiological Update: Neurological syndrome, congenital anomalies and Zika virus infection, 17 January 2016. Washington, DC: PAHO/WHO; 2016.

(http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32879&lang=em).

European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome – 10 December 2015. Stockholm: ECDC; 2015.

(<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/zika-virus-americas-association-with-microcephaly-rapid-risk-assessment.pdf>).

7.2 Bibliografias indexadas

Abràmoff, M. D., P. J. Magalhães and S. J. Ram (2004). "Image processing with ImageJ." *Biophotonics international* **11**(7): 36-42.

Agostini, M., F. Romeo, S. Inoue, M. V. Niklison-Chirou, A. J. Elia, D. Dinsdale, N. Morone, R. A. Knight, T. W. Mak and G. Melino (2016). "Metabolic reprogramming during neuronal differentiation." *Cell Death Differ* **23**(9): 1502-1514.

Ahn, J., Y. Jee, I. Seo, S. Y. Yoon, D. Kim, Y. K. Kim and H. Lee (2008). "Primary neurons become less susceptible to coxsackievirus B5 following maturation: the correlation with the decreased level of CAR expression on cell surface." *J Med Virol* **80**(3): 434-440.

Airo, A. M., M. D. Urbanowski, J. Lopez-Orozco, J. H. You, T. D. Skene-Arnold, C. Holmes, V. Yamshchikov, N. Malik-Soni, L. Frappier and T. C. Hobman (2018). "Expression of flavivirus capsids enhance the cellular environment for viral replication by activating Akt-signalling pathways." *Virology* **516**: 147-157.

Almeida, R. D., B. J. Manadas, C. V. Melo, J. R. Gomes, C. S. Mendes, M. M. Graos, R. F. Carvalho, A. P. Carvalho and C. B. Duarte (2005). "Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways." *Cell Death Differ* **12**(10): 1329-1343.

Alvarez, S., A. Blanco, M. Fresno and M. A. Munoz-Fernandez (2011). "TNF-alpha contributes to caspase-3 independent apoptosis in neuroblastoma cells: role of NFAT." *PLoS One* **6**(1): e16100.

Ankarcrona, M., J. M. Dypbukt, E. Bonfoco, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, S. A. Lipton and P. Nicotera (1995). "Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function." *Neuron* **15**(4): 961-973.

- Araujo, F., R. Nogueira, S. Araujo Mde, A. Perdigao, L. Cavalcanti, R. Brilhante, M. Rocha, D. F. Vilar, S. S. Holanda, M. Braga Dde and J. Sidrim (2012). "Dengue in patients with central nervous system manifestations, Brazil." Emerg Infect Dis **18**(4): 677-679.
- Bading, H., D. D. Ginty and M. E. Greenberg (1993). "Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways." Science **260**(5105): 181-186.
- Benarroch, E. E. (2011). "NMDA receptors: recent insights and clinical correlations." Neurology **76**(20): 1750-1757.
- Bondy, S. C. and C. P. LeBel (1993). "The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system." Free Radic Biol Med **14**(6): 633-642.
- Buchman, J. J., H. C. Tseng, Y. Zhou, C. L. Frank, Z. Xie and L. H. Tsai (2010). "Cdk5rap2 interacts with pericentrin to maintain the neural progenitor pool in the developing neocortex." Neuron **66**(3): 386-402.
- Calvet, G., R. S. Aguiar, A. S. O. Melo, S. A. Sampaio, I. de Filippis, A. Fabri, E. S. M. Araujo, P. C. de Sequeira, M. C. L. de Mendonca, L. de Oliveira, D. A. Tschoeke, C. G. Schrago, F. L. Thompson, P. Brasil, F. B. Dos Santos, R. M. R. Nogueira, A. Tanuri and A. M. B. de Filippis (2016). "Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study." Lancet Infect Dis **16**(6): 653-660.
- Cao-Lormeau, V. M., A. Blake, S. Mons, S. Lastere, C. Roche, J. Vanhomwegen, T. Dub, L. Baudouin, A. Teissier, P. Larre, A. L. Vial, C. Decam, V. Choumet, S. K. Halstead, H. J. Willison, L. Musset, J. C. Manuguerra, P. Despres, E. Fournier, H. P. Mallet, D. Musso, A. Fontanet, J. Neil and F. Ghawche (2016). "Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study." Lancet **387**(10027): 1531-1539.
- Cao-Lormeau, V. M., C. Roche, A. Teissier, E. Robin, A. L. Berry, H. P. Mallet, A. A. Sall and D. Musso (2014). "Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013." Emerg Infect Dis **20**(6): 1085-1086.
- Carod-Artal, F. J., O. Wichmann, J. Farrar and J. Gascon (2013). "Neurological complications of dengue virus infection." Lancet Neurol **12**(9): 906-919.
- Chandler, L. J., G. Sutton, N. R. Dorairaj and D. Norwood (2001). "N-methyl D-aspartate receptor-mediated bidirectional control of extracellular signal-regulated kinase activity in cortical neuronal cultures." J Biol Chem **276**(4): 2627-2636.
- Chen, C. J., Y. C. Ou, C. Y. Chang, H. C. Pan, S. L. Liao, S. Y. Chen, S. L. Raung and C. Y. Lai (2012). "Glutamate released by Japanese encephalitis virus-infected microglia involves TNF-alpha signaling and contributes to neuronal death." Glia **60**(3): 487-501.
- Chen, H. S., J. W. Pellegrini, S. K. Aggarwal, S. Z. Lei, S. Warach, F. E. Jensen and S. A. Lipton (1992). "Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity." J Neurosci **12**(11): 4427-4436.
- Chen, H. S., Y. F. Wang, P. V. Rayudu, P. Edgecomb, J. C. Neill, M. M. Segal, S. A. Lipton and F. E. Jensen (1998). "Neuroprotective concentrations of the N-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation." Neuroscience **86**(4): 1121-1132.
- Choi, D. W. (1987). "Ionic dependence of glutamate neurotoxicity." J Neurosci **7**(2): 369-379.

- Choi, D. W., J. Y. Koh and S. Peters (1988). "Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists." J Neurosci **8**(1): 185-196.
- Choi, D. W., M. Maulucci-Gedde and A. R. Kriegstein (1987). "Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture." J Neurosci **7**(2): 357-368.
- Collins, T. J. (2007). "ImageJ for microscopy." Biotechniques **43**(1 Suppl): 25-30.
- Conti, F., A. Minelli, S. DeBiasi and M. Melone (1997). "Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex." Mol Neurobiol **14**(1-2): 1-18.
- Costa, V. V., J. L. Del Sarto, R. F. Rocha, F. R. Silva, J. G. Doria, I. G. Olmo, R. E. Marques, C. M. Queiroz-Junior, G. Foureaux, J. M. S. Araujo, A. Cramer, A. Real, L. S. Ribeiro, S. I. Sardi, A. J. Ferreira, F. S. Machado, A. C. de Oliveira, A. L. Teixeira, H. I. Nakaya, D. G. Souza, F. M. Ribeiro and M. M. Teixeira (2017). "N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptor Blockade Prevents Neuronal Death Induced by Zika Virus Infection." MBio **8**(2).
- Costa, V. V., C. T. Fagundes, D. F. Valadao, T. V. Avila, D. Cisalpino, R. F. Rocha, L. S. Ribeiro, F. R. Ascencao, L. M. Kangussu, M. Q. Celso, Jr., R. G. Astigarraga, F. L. Gouveia, T. A. Silva, D. Bonaventura, A. Sampaio Dde, A. C. Leite, M. M. Teixeira and D. G. Souza (2014). "Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection induces severe disease in immunocompetent mice." Med Microbiol Immunol **203**(4): 231-250.
- Cugola, F. R., I. R. Fernandes, F. B. Russo, B. C. Freitas, J. L. Dias, K. P. Guimaraes, C. Benazzato, N. Almeida, G. C. Pignatari, S. Romero, C. M. Polonio, I. Cunha, C. L. Freitas, W. N. Brandao, C. Rossato, D. G. Andrade, P. Faria Dde, A. T. Garcez, C. A. Buchpigel, C. T. Braconi, E. Mendes, A. A. Sall, P. M. Zanotto, J. P. Peron, A. R. Muotri and P. C. Beltrao-Braga (2016). "The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models." Nature **534**(7606): 267-271.
- Dang, J., S. K. Tiwari, G. Lichinchi, Y. Qin, V. S. Patil, A. M. Eroshkin and T. M. Rana (2016). "Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3." Cell Stem Cell **19**(2): 258-265.
- Darman, J., S. Backovic, S. Dike, N. J. Maragakis, C. Krishnan, J. D. Rothstein, D. N. Irani and D. A. Kerr (2004). "Viral-induced spinal motor neuron death is non-cell-autonomous and involves glutamate excitotoxicity." J Neurosci **24**(34): 7566-7575.
- de Paula Freitas, B., J. R. de Oliveira Dias, J. Prazeres, G. A. Sacramento, A. I. Ko, M. Maia and R. Belfort, Jr. (2016). "Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil." JAMA Ophthalmol.
- Dejnirattisai, W., P. Supasa, W. Wongwiwat, A. Rouvinski, G. Barba-Spaeth, T. Duangchinda, A. Sakuntabhai, V. M. Cao-Lormeau, P. Malasit, F. A. Rey, J. Mongkolsapaya and G. R. Screaton (2016). "Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus." Nat Immunol **17**(9): 1102-1108.
- Devakumar, D., A. Bamford, M. U. Ferreira, J. Broad, R. E. Rosch, N. Groce, J. Breuer, M. A. Cardoso, A. J. Copp, P. Alexandre, L. C. Rodrigues and I. Abubakar (2018). "Infectious causes of microcephaly: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management." Lancet Infect Dis **18**(1): e1-e13.
- Dick, G. W., S. F. Kitchen and A. J. Haddow (1952). "Zika virus. I. Isolations and serological specificity." Trans R Soc Trop Med Hyg **46**(5): 509-520.

Dong, Y., A. V. Kalueff and C. Song (2017). "N-methyl-d-aspartate receptor-mediated calcium overload and endoplasmic reticulum stress are involved in interleukin-1beta-induced neuronal apoptosis in rat hippocampus." J Neuroimmunol **307**: 7-13.

Doria, J. G., F. R. Silva, J. M. de Souza, L. B. Vieira, T. G. Carvalho, H. J. Reis, G. S. Pereira, T. Dobransky and F. M. Ribeiro (2013). "Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease." Br J Pharmacol **169**(4): 909-921.

Du, K. and M. Montminy (1998). "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB." J Biol Chem **273**(49): 32377-32379.

Duffy, M. R., T. H. Chen, W. T. Hancock, A. M. Powers, J. L. Kool, R. S. Lanciotti, M. Pretrick, M. Marfel, S. Holzbauer, C. Dubray, L. Guillaumot, A. Griggs, M. Bel, A. J. Lambert, J. Laven, O. Kosoy, A. Panella, B. J. Biggerstaff, M. Fischer and E. B. Hayes (2009). "Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia." N Engl J Med **360**(24): 2536-2543.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.

Enslin, H., P. Sun, D. Brickey, S. H. Soderling, E. Klamo and T. R. Soderling (1994). "Characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation." J Biol Chem **269**(22): 15520-15527.

Faria, N. R., R. Azevedo, M. U. G. Kraemer, R. Souza, M. S. Cunha, S. C. Hill, J. Theze, M. B. Bonsall, T. A. Bowden, I. Rissanen, I. M. Rocco, J. S. Nogueira, A. Y. Maeda, F. Vasami, F. L. L. Macedo, A. Suzuki, S. G. Rodrigues, A. C. R. Cruz, B. T. Nunes, D. B. A. Medeiros, D. S. G. Rodrigues, A. L. N. Queiroz, E. V. P. da Silva, D. F. Henriques, E. S. T. da Rosa, C. S. de Oliveira, L. C. Martins, H. B. Vasconcelos, L. M. N. Casseb, D. B. Simith, J. P. Messina, L. Abade, J. Lourenco, L. C. J. Alcantara, M. M. de Lima, M. Giovanetti, S. I. Hay, R. S. de Oliveira, P. D. S. Lemos, L. F. de Oliveira, C. P. S. de Lima, S. P. da Silva, J. M. de Vasconcelos, L. Franco, J. F. Cardoso, J. Vianez-Junior, D. Mir, G. Bello, E. Delatorre, K. Khan, M. Creatore, G. E. Coelho, W. K. de Oliveira, R. Tesh, O. G. Pybus, M. R. T. Nunes and P. F. C. Vasconcelos (2016). "Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings." Science **352**(6283): 345-349.

Floden, A. M., S. Li and C. K. Combs (2005). "Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors." J Neurosci **25**(10): 2566-2575.

Fogal, B. and S. J. Hewett (2008). "Interleukin-1beta: a bridge between inflammation and excitotoxicity?" J Neurochem **106**(1): 1-23.

Garcez, P. P., E. C. Loiola, R. Madeiro da Costa, L. M. Higa, P. Trindade, R. Delvecchio, J. M. Nascimento, R. Brindeiro, A. Tanuri and S. K. Rehen (2016). "Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids." Science **352**(6287): 816-818.

Garcez, P. P., J. M. Nascimento, J. M. de Vasconcelos, R. Madeiro da Costa, R. Delvecchio, P. Trindade, E. C. Loiola, L. M. Higa, J. S. Cassoli, G. Vitoria, P. C. Sequeira, J. Sochacki, R. S. Aguiar, H. T. Fuzii, A. M. de Filippis, J. L. da Silva Goncalves Vianez Junior, A. Tanuri, D. Martins-de-Souza and S. K. Rehen (2017). "Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres." Sci Rep **7**: 40780.

Gaur, U. and B. B. Aggarwal (2003). "Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily." Biochem Pharmacol **66**(8): 1403-1408.

- Gavrieli, Y., Y. Sherman and S. A. Ben-Sasson (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." J Cell Biol **119**(3): 493-501.
- Groc, L., M. Heine, S. L. Cousins, F. A. Stephenson, B. Lounis, L. Cognet and D. Choquet (2006). "NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(49): 18769-18774.
- Guzman, M. G. and S. Vazquez (2010). "The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection." Viruses **2**(12): 2649-2662.
- Hamel, R., O. Dejarnac, S. Wichit, P. Ekchariyawat, A. Neyret, N. Luplertlop, M. Perera-Lecoin, P. Surasombatpattana, L. Talignani, F. Thomas, V. M. Cao-Lormeau, V. Choumet, L. Briant, P. Despres, A. Amara, H. Yssel and D. Misse (2015). "Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells." J Virol **89**(17): 8880-8896.
- Hardingham, G. E., F. J. Arnold and H. Bading (2001). "Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity." Nat Neurosci **4**(3): 261-267.
- Hardingham, G. E. and H. Bading (2010). "Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders." Nat Rev Neurosci **11**(10): 682-696.
- Hardingham, G. E., Y. Fukunaga and H. Bading (2002). "Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways." Nat Neurosci **5**(5): 405-414.
- Hastings, A. K., L. J. Yockey, B. W. Jagger, J. Hwang, R. Uraki, H. F. Gaitsch, L. A. Parnell, B. Cao, I. U. Mysorekar, C. V. Rothlin, E. Fikrig, M. S. Diamond and A. Iwasaki (2017). "TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice." Cell Rep **19**(3): 558-568.
- Huang, W. C., R. Abraham, B. S. Shim, H. Choe and D. T. Page (2016). "Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice." Sci Rep **6**: 34793.
- Hughes, B. W., K. C. Addanki, A. N. Sriskanda, E. McLean and O. Bagasra (2016). "Infectivity of Immature Neurons to Zika Virus: A Link to Congenital Zika Syndrome." EBioMedicine **10**: 65-70.
- Irani, D. N. and N. A. Prow (2007). "Neuroprotective interventions targeting detrimental host immune responses protect mice from fatal alphavirus encephalitis." J Neuropathol Exp Neurol **66**(6): 533-544.
- James, H. J., L. R. Sharer, Q. Zhang, H. G. Wang, L. G. Epstein, J. C. Reed and H. A. Gelbard (1999). "Expression of caspase-3 in brains from paediatric patients with HIV-1 encephalitis." Neuropathol Appl Neurobiol **25**(5): 380-386.
- Jara, J. H., B. B. Singh, A. M. Floden and C. K. Combs (2007). "Tumor necrosis factor alpha stimulates NMDA receptor activity in mouse cortical neurons resulting in ERK-dependent death." J Neurochem **100**(5): 1407-1420.
- Johnson, J. W. and S. E. Kotermanski (2006). "Mechanism of action of memantine." Curr Opin Pharmacol **6**(1): 61-67.
- Kaushal, V., R. Dye, P. Pakavathkumar, B. Foveau, J. Flores, B. Hyman, B. Ghetti, B. H. Koller and A. C. LeBlanc (2015). "Neuronal NLRP1 inflammasome activation of Caspase-1 coordinately regulates inflammatory interleukin-1-beta production and axonal degeneration-associated Caspase-6 activation." Cell Death Differ **22**(10): 1676-1686.

- Keightley, M. C., M. O. Crowhurst, J. E. Layton, T. Beilharz, S. Markmiller, S. Varma, B. M. Hogan, T. A. de Jong-Curtain, J. K. Heath and G. J. Lieschke (2013). "In vivo mutation of pre-mRNA processing factor 8 (Prpf8) affects transcript splicing, cell survival and myeloid differentiation." FEBS Lett **587**(14): 2150-2157.
- Kim, M. J., A. W. Dunah, Y. T. Wang and M. Sheng (2005). "Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking." Neuron **46**(5): 745-760.
- Kole, A. J., R. P. Annis and M. Deshmukh (2013). "Mature neurons: equipped for survival." Cell Death Dis **4**: e689.
- Krapivinsky, G., L. Krapivinsky, Y. Manasian, A. Ivanov, R. Tyzio, C. Pellegrino, Y. Ben-Ari, D. E. Clapham and I. Medina (2003). "The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1." Neuron **40**(4): 775-784.
- Krauer, F., M. Riesen, L. Reveiz, O. T. Oladapo, R. Martinez-Vega, T. V. Porgo, A. Haefliger, N. J. Broutet, N. Low and W. H. O. Z. C. W. Group (2017). "Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain-Barre Syndrome: Systematic Review." PLoS Med **14**(1): e1002203.
- Kumar, M., S. Verma and V. R. Nerurkar (2010). "Pro-inflammatory cytokines derived from West Nile virus (WNV)-infected SK-N-SH cells mediate neuroinflammatory markers and neuronal death." J Neuroinflammation **7**: 73.
- Kushnareva, Y. E., S. E. Wiley, M. W. Ward, A. Y. Andreyev and A. N. Murphy (2005). "Excitotoxic injury to mitochondria isolated from cultured neurons." J Biol Chem **280**(32): 28894-28902.
- Lancaster, M. A., M. Renner, C. A. Martin, D. Wenzel, L. S. Bicknell, M. E. Hurles, T. Homfray, J. M. Penninger, A. P. Jackson and J. A. Knoblich (2013). "Cerebral organoids model human brain development and microcephaly." Nature **501**(7467): 373-379.
- Lee, C. J., C. L. Liao and Y. L. Lin (2005). "Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection." J Virol **79**(13): 8388-8399.
- Lemrow, S. M., K. A. Anderson, J. D. Joseph, T. J. Ribar, P. K. Noeldner and A. R. Means (2004). "Catalytic activity is required for calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV to enter the nucleus." J Biol Chem **279**(12): 11664-11671.
- Lesuisse, C. and L. J. Martin (2002). "Immature and mature cortical neurons engage different apoptotic mechanisms involving caspase-3 and the mitogen-activated protein kinase pathway." J Cereb Blood Flow Metab **22**(8): 935-950.
- Li, H., L. Saucedo-Cuevas, S. Shresta and J. G. Gleeson (2016). "The Neurobiology of Zika Virus." Neuron **92**(5): 949-958.
- Li, J., J. A. Loeb, M. E. Shy, A. K. Shah, A. C. Tselis, W. J. Kupski and R. A. Lewis (2003). "Asymmetric flaccid paralysis: a neuromuscular presentation of West Nile virus infection." Ann Neurol **53**(6): 703-710.
- Liao, C. L., Y. L. Lin, J. J. Wang, Y. L. Huang, C. T. Yeh, S. H. Ma and L. K. Chen (1997). "Effect of enforced expression of human bcl-2 on Japanese encephalitis virus-induced apoptosis in cultured cells." J Virol **71**(8): 5963-5971.

- Lipton, S. A. (2004). "Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults." NeuroRx **1**(1): 101-110.
- Lipton, S. A. (2006). "Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond." Nat Rev Drug Discov **5**(2): 160-170.
- Lipton, S. A. and P. Nicotera (1998). "Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis." Cell Calcium **23**(2-3): 165-171.
- Lipton, S. A. and P. A. Rosenberg (1994). "Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders." N Engl J Med **330**(9): 613-622.
- Liu, T., R. K. Clark, P. C. McDonnell, P. R. Young, R. F. White, F. C. Barone and G. Z. Feuerstein (1994). "Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons." Stroke **25**(7): 1481-1488.
- Liu, Y., T. P. Wong, M. Aarts, A. Rooyackers, L. Liu, T. W. Lai, D. C. Wu, J. Lu, M. Tymianski, A. M. Craig and Y. T. Wang (2007). "NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo." J Neurosci **27**(11): 2846-2857.
- Liu, Y. C., R. L. Kuo, J. Y. Lin, P. N. Huang, Y. Huang, H. Liu, J. J. Arnold, S. J. Chen, R. Y. Wang, C. E. Cameron and S. R. Shih (2014). "Cytoplasmic viral RNA-dependent RNA polymerase disrupts the intracellular splicing machinery by entering the nucleus and interfering with Prp8." PLoS Pathog **10**(6): e1004199.
- Lonze, B. E., A. Riccio, S. Cohen and D. D. Ginty (2002). "Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB." Neuron **34**(3): 371-385.
- Ludlow, M., J. Kortekaas, C. Herden, B. Hoffmann, D. Tappe, C. Trebst, D. E. Griffin, H. E. Brindle, T. Solomon, A. S. Brown, D. van Riel, K. C. Wolthers, D. Pajkrt, P. Wohlsein, B. E. E. Martina, W. Baumgartner, G. M. Verjans and A. Osterhaus (2016). "Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology." Acta Neuropathol **131**(2): 159-184.
- Lum, F. M., D. K. Low, Y. Fan, J. J. Tan, B. Lee, J. K. Chan, L. Renia, F. Ginhoux and L. F. Ng (2017). "Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces Inflammation." Clin Infect Dis **64**(7): 914-920.
- Marchette, N. J., R. Garcia and A. Rudnick (1969). "Isolation of Zika virus from Aedes aegypti mosquitoes in Malaysia." Am J Trop Med Hyg **18**(3): 411-415.
- Martel, M. A., T. J. Ryan, K. F. Bell, J. H. Fowler, A. McMahon, B. Al-Mubarak, N. H. Komiyama, K. Horsburgh, P. C. Kind, S. G. Grant, D. J. Wyllie and G. E. Hardingham (2012). "The subtype of GluN2 C-terminal domain determines the response to excitotoxic insults." Neuron **74**(3): 543-556.
- Martel, M. A., D. J. Wyllie and G. E. Hardingham (2009). "In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death." Neuroscience **158**(1): 334-343.
- Martines, R. B., J. Bhatnagar, M. K. Keating, L. Silva-Flannery, A. Muehlenbachs, J. Gary, C. Goldsmith, G. Hale, J. Ritter, D. Rollin, W. J. Shieh, K. G. Luz, A. M. Ramos, H. P. Davi, W. Kleber de Oliveria, R. Lanciotti, A. Lambert and S. Zaki (2016). "Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally

Infected Newborns and Two Fetal Losses--Brazil, 2015." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **65**(6): 159-160.

Matthews, R. P., C. R. Guthrie, L. M. Wailes, X. Zhao, A. R. Means and G. S. McKnight (1994). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression." Mol Cell Biol **14**(9): 6107-6116.

McCracken, M. K., G. D. Gromowski, H. L. Friberg, X. Lin, P. Abbink, R. De La Barrera, K. H. Eckles, L. S. Garver, M. Boyd, D. Jetton, D. H. Barouch, M. C. Wise, B. S. Lewis, J. R. Currier, K. Modjarrad, M. Milazzo, M. Liu, A. B. Mullins, J. R. Putnak, N. L. Michael, R. G. Jarman and S. J. Thomas (2017). "Impact of prior flavivirus immunity on Zika virus infection in rhesus macaques." PLoS Pathog **13**(8): e1006487.

Meertens, L., X. Carnec, M. P. Lecoin, R. Ramdasi, F. Guivel-Benhassine, E. Lew, G. Lemke, O. Schwartz and A. Amara (2012). "The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry." Cell Host Microbe **12**(4): 544-557.

Meertens, L., A. Labeau, O. Dejarnac, S. Cipriani, L. Sinigaglia, L. Bonnet-Madin, T. Le Charpentier, M. L. Hafirassou, A. Zamborlini, V. M. Cao-Lormeau, M. Croupier, D. Misse, N. Jouvenet, R. Tabibiazar, P. Gressens, O. Schwartz and A. Amara (2017). "Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses." Cell Rep **18**(2): 324-333.

Milnerwood, A. J., C. M. Gladding, M. A. Pouladi, A. M. Kaufman, R. M. Hines, J. D. Boyd, R. W. Ko, O. C. Vasuta, R. K. Graham, M. R. Hayden, T. H. Murphy and L. A. Raymond (2010). "Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice." Neuron **65**(2): 178-190.

Mlakar, J., M. Korva, N. Tul, M. Popovic, M. Poljsak-Prijatelj, J. Mraz, M. Kolenc, K. Resman Rus, T. Vesnaver Vipotnik, V. Fabjan Vodusek, A. Vizjak, J. Pizem, M. Petrovec and T. Avsic Zupanc (2016). "Zika Virus Associated with Microcephaly." N Engl J Med **374**(10): 951-958.

Monyer, H., N. Burnashev, D. J. Laurie, B. Sakmann and P. H. Seeburg (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." Neuron **12**(3): 529-540.

Moodley, B., S. Tempia and J. A. Frean (2017). "Comparison of quantitative real-time PCR and direct immunofluorescence for the detection of *Pneumocystis jirovecii*." PLoS One **12**(7): e0180589.

Mori, H., H. Masaki, T. Yamakura and M. Mishina (1992). "Identification by mutagenesis of a Mg(2+)-block site of the NMDA receptor channel." Nature **358**(6388): 673-675.

Musso, D. (2015). "Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil." Emerg Infect Dis **21**(10): 1887.

Nicholls, D. G., T. S. Sihra and J. Sanchez-Prieto (1987). "Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry." J Neurochem **49**(1): 50-57.

Nowak, L., P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet and A. Prochiantz (1984). "Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones." Nature **307**(5950): 462-465.

Nuovo, G. J., F. Gallery, P. MacConnell and A. Braun (1994). "In situ detection of polymerase chain reaction-amplified HIV-1 nucleic acids and tumor necrosis factor-alpha RNA in the central nervous system." Am J Pathol **144**(4): 659-666.

- Oehler, E., L. Watrin, P. Larre, I. Leparç-Goffart, S. Lastere, F. Valour, L. Baudouin, H. Mallet, D. Musso and F. Ghawche (2014). "Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013." Euro Surveill **19**(9).
- Olmo, I. G., T. G. Carvalho, V. V. Costa, J. Alves-Silva, C. Z. Ferrari, T. C. Izidoro-Toledo, J. F. da Silva, A. L. Teixeira, D. G. Souza, J. T. Marques, M. M. Teixeira, L. B. Vieira and F. M. Ribeiro (2017). "Zika Virus Promotes Neuronal Cell Death in a Non-Cell Autonomous Manner by Triggering the Release of Neurotoxic Factors." Front Immunol **8**: 1016.
- Olmos, G. and J. Llado (2014). "Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity." Mediators Inflamm **2014**: 861231.
- Olney, J. W., J. Labruyere and M. T. Price (1989). "Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs." Science **244**(4910): 1360-1362.
- Pantoja, P., E. X. Perez-Guzman, I. V. Rodriguez, L. J. White, O. Gonzalez, C. Serrano, L. Giavedoni, V. Hodara, L. Cruz, T. Arana, M. I. Martinez, M. A. Hassert, J. D. Brien, A. K. Pinto, A. de Silva and C. A. Sariol (2017). "Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus." Nat Commun **8**: 15674.
- Paoletti, P., C. Bellone and Q. Zhou (2013). "NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease." Nat Rev Neurosci **14**(6): 383-400.
- Parquet, M. C., A. Kumatori, F. Hasebe, K. Morita and A. Igarashi (2001). "West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis." FEBS Lett **500**(1-2): 17-24.
- Parsons, C. G., W. Danysz and G. Quack (1999). "Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data." Neuropharmacology **38**(6): 735-767.
- Paul, L. M., E. R. Carlin, M. M. Jenkins, A. L. Tan, C. M. Barcellona, C. O. Nicholson, S. F. Michael and S. Isern (2016). "Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection." Clin Transl Immunology **5**(12): e117.
- Perera-Lecoin, M., L. Meertens, X. Carnec and A. Amara (2013). "Flavivirus entry receptors: an update." Viruses **6**(1): 69-88.
- Petersen, L. R. and A. A. Marfin (2002). "West Nile virus: a primer for the clinician." Ann Intern Med **137**(3): 173-179.
- Petralia, R. S. (2012). "Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons." ScientificWorldJournal **2012**: 267120.
- Pickering, M., D. Cumiskey and J. J. O'Connor (2005). "Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system." Exp Physiol **90**(5): 663-670.
- Prow, N. A. and D. N. Irani (2008). "The inflammatory cytokine, interleukin-1 beta, mediates loss of astroglial glutamate transport and drives excitotoxic motor neuron injury in the spinal cord during acute viral encephalomyelitis." J Neurochem **105**(4): 1276-1286.
- Ribeiro, G. S. and U. Kitron (2016). "Zika virus pandemic: a human and public health crisis." Rev Soc Bras Med Trop **49**(1): 1-3.
- Roth, A., A. Mercier, C. Lepers, D. Hoy, S. Duituturaga, E. Benyon, L. Guillaumot and Y. Souares (2014). "Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014." Euro Surveill **19**(41).

- Sakamoto, K., K. Karelina and K. Obrietan (2011). "CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection." J Neurochem **116**(1): 1-9.
- Sarno, M., G. A. Sacramento, R. Khouri, M. S. do Rosario, F. Costa, G. Archanjo, L. A. Santos, N. Nery, Jr., N. Vasilakis, A. I. Ko and A. R. de Almeida (2016). "Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise." PLoS Negl Trop Dis **10**(2): e0004517.
- Scheiblich, H., A. Schlutter, D. T. Golenbock, E. Latz, P. Martinez-Martinez and M. T. Heneka (2017). "Activation of the NLRP3 inflammasome in microglia: the role of ceramide." J Neurochem **143**(5): 534-550.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband and K. W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nat Methods **9**(7): 671-675.
- Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The inflammasomes." Cell **140**(6): 821-832.
- Schwartz, D. A. (2017). "Autopsy and Postmortem Studies Are Concordant: Pathology of Zika Virus Infection Is Neurotropic in Fetuses and Infants With Microcephaly Following Transplacental Transmission." Arch Pathol Lab Med **141**(1): 68-72.
- Seckinger, P., J. W. Lowenthal, K. Williamson, J. M. Dayer and H. R. MacDonald (1987). "A urine inhibitor of interleukin 1 activity that blocks ligand binding." J Immunol **139**(5): 1546-1549.
- Shao, Q., S. Herrlinger, S. L. Yang, F. Lai, J. M. Moore, M. A. Brindley and J. F. Chen (2016). "Zika virus infection disrupts neurovascular development and results in postnatal microcephaly with brain damage." Development **143**(22): 4127-4136.
- Shrestha, B., D. Gottlieb and M. S. Diamond (2003). "Infection and injury of neurons by West Nile encephalitis virus." J Virol **77**(24): 13203-13213.
- Skog, O., S. Ingvast and O. Korsgren (2014). "Evaluation of RT-PCR and immunohistochemistry as tools for detection of enterovirus in the human pancreas and islets of Langerhans." J Clin Virol **61**(2): 242-247.
- Steed, P. M., M. G. Tansey, J. Zalevsky, E. A. Zhukovsky, J. R. Desjarlais, D. E. Szymkowski, C. Abbott, D. Carmichael, C. Chan, L. Cherry, P. Cheung, A. J. Chirino, H. H. Chung, S. K. Doberstein, A. Eivazi, A. V. Filikov, S. X. Gao, R. S. Hubert, M. Hwang, L. Hyun, S. Kashi, A. Kim, E. Kim, J. Kung, S. P. Martinez, U. S. Muchhal, D. H. Nguyen, C. O'Brien, D. O'Keefe, K. Singer, O. Vafa, J. Vielmetter, S. C. Yoder and B. I. Dahiya (2003). "Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants." Science **301**(5641): 1895-1898.
- Steigerwald, F., T. W. Schulz, L. T. Schenker, M. B. Kennedy, P. H. Seeburg and G. Kohr (2000). "C-Terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors." J Neurosci **20**(12): 4573-4581.
- Su, H. L., C. L. Liao and Y. L. Lin (2002). "Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response." J Virol **76**(9): 4162-4171.
- Szymocha, R., H. Akaoka, M. Dutuit, C. Malcus, M. Didier-Bazes, M. F. Belin and P. Giraudon (2000). "Human T-cell lymphotropic virus type 1-infected T lymphocytes impair catabolism and uptake of glutamate by astrocytes via Tax-1 and tumor necrosis factor alpha." J Virol **74**(14): 6433-6441.
- Takeuchi, H., S. Jin, J. Wang, G. Zhang, J. Kawanokuchi, R. Kuno, Y. Sonobe, T. Mizuno and A. Suzumura (2006). "Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release

from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner." *J Biol Chem* **281**(30): 21362-21368.

Talley, A. K., S. Dewhurst, S. W. Perry, S. C. Dollard, S. Gummuluru, S. M. Fine, D. New, L. G. Epstein, H. E. Gendelman and H. A. Gelbard (1995). "Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2359-2366.

Tang, H., C. Hammack, S. C. Ogden, Z. Wen, X. Qian, Y. Li, B. Yao, J. Shin, F. Zhang, E. M. Lee, K. M. Christian, R. A. Didier, P. Jin, H. Song and G. L. Ming (2016). "Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth." *Cell Stem Cell* **18**(5): 587-590.

Thomas, G. M. and R. L. Huganir (2004). "MAPK cascade signalling and synaptic plasticity." *Nat Rev Neurosci* **5**(3): 173-183.

Toivari, E., T. Manninen, A. K. Nahata, T. O. Jalonen and M. L. Linne (2011). "Effects of transmitters and amyloid-beta peptide on calcium signals in rat cortical astrocytes: Fura-2AM measurements and stochastic model simulations." *PLoS One* **6**(3): e17914.

Tovar, K. R. and G. L. Westbrook (1999). "The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro." *J Neurosci* **19**(10): 4180-4188.

Tu, W., X. Xu, L. Peng, X. Zhong, W. Zhang, M. M. Soundarapandian, C. Balel, M. Wang, N. Jia, W. Zhang, F. Lew, S. L. Chan, Y. Chen and Y. Lu (2010). "DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke." *Cell* **140**(2): 222-234.

Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm and S. G. Rozen (2012). "Primer3--new capabilities and interfaces." *Nucleic Acids Res* **40**(15): e115.

Urbanowski, M. D. and T. C. Hobman (2013). "The West Nile virus capsid protein blocks apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism." *J Virol* **87**(2): 872-881.

van der Linden, V., A. Pessoa, W. Dobyns, A. J. Barkovich, H. V. Junior, E. L. Filho, E. M. Ribeiro, M. C. Leal, P. P. Coimbra, M. F. Aragao, I. Vercosa, C. Ventura, R. C. Ramos, D. D. Cruz, M. T. Cordeiro, V. M. Mota, M. Dott, C. Hillard and C. A. Moore (2016). "Description of 13 Infants Born During October 2015-January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **65**(47): 1343-1348.

Vanhoutte, P. and H. Bading (2003). "Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation." *Curr Opin Neurobiol* **13**(3): 366-371.

Vashishta, A., A. Habas, P. Pruunsild, J. J. Zheng, T. Timmusk and M. Hetman (2009). "Nuclear factor of activated T-cells isoform c4 (NFATc4/NFAT3) as a mediator of antiapoptotic transcription in NMDA receptor-stimulated cortical neurons." *J Neurosci* **29**(48): 15331-15340.

Ventura, C. V., M. Maia, V. Bravo-Filho, A. L. Gois and R. Belfort, Jr. (2016). "Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly." *Lancet* **387**(10015): 228.

Viviani, B., S. Bartesaghi, F. Gardoni, A. Vezzani, M. M. Behrens, T. Bartfai, M. Binaglia, E. Corsini, M. Di Luca, C. L. Galli and M. Marinovich (2003). "Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases." *J Neurosci* **23**(25): 8692-8700.

- Wang, A., S. Thurmond, L. Islas, K. Hui and R. Hai (2017). "Zika virus genome biology and molecular pathogenesis." Emerg Microbes Infect **6**(3): e13.
- Wang, J., J. Liu, R. Zhou, X. Ding, Q. Zhang, C. Zhang and L. Li (2018). "Zika virus infected primary microglia impairs NPCs proliferation and differentiation." Biochem Biophys Res Commun **497**(2): 619-625.
- Wang, W., G. Li, W. De, Z. Luo, P. Pan, M. Tian, Y. Wang, F. Xiao, A. Li, K. Wu, X. Liu, L. Rao, F. Liu, Y. Liu and J. Wu (2018). "Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1beta secretion." Nat Commun **9**(1): 106.
- Weaver-Mikaere, L., A. J. Gunn, M. D. Mitchell, L. Bennet and M. Fraser (2013). "LPS and TNF alpha modulate AMPA/NMDA receptor subunit expression and induce PGE2 and glutamate release in preterm fetal ovine mixed glial cultures." J Neuroinflammation **10**: 153.
- Williams, K. (2001). "Ifenprodil, a novel NMDA receptor antagonist: site and mechanism of action." Curr Drug Targets **2**(3): 285-298.
- Willison, H. J., B. C. Jacobs and P. A. van Doorn (2016). "Guillain-Barre syndrome." Lancet **388**(10045): 717-727.
- Wong, E. H., J. A. Kemp, T. Priestley, A. R. Knight, G. N. Woodruff and L. L. Iversen (1986). "The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(18): 7104-7108.
- Woods, C. G. (2004). "Human microcephaly." Curr Opin Neurobiol **14**(1): 112-117.
- Wu, G. Y., K. Deisseroth and R. W. Tsien (2001). "Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2808-2813.
- Xia, P., H. S. Chen, D. Zhang and S. A. Lipton (2010). "Memantine preferentially blocks extrasynaptic over synaptic NMDA receptor currents in hippocampal autapses." J Neurosci **30**(33): 11246-11250.
- Xu, M., E. M. Lee, Z. Wen, Y. Cheng, W. K. Huang, X. Qian, J. Tcw, J. Kouznetsova, S. C. Ogden, C. Hammack, F. Jacob, H. N. Nguyen, M. Itkin, C. Hanna, P. Shinn, C. Allen, S. G. Michael, A. Simeonov, W. Huang, K. M. Christian, A. Goate, K. J. Brennand, R. Huang, M. Xia, G. L. Ming, W. Zheng, H. Song and H. Tang (2016). "Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen." Nat Med **22**(10): 1101-1107.
- Zanelli, S. A., Y. Numagami, J. E. McGowan, O. P. Mishra and M. Delivoria-Papadopoulos (1999). "NMDA receptor-mediated calcium influx in cerebral cortical synaptosomes of the hypoxic guinea pig fetus." Neurochem Res **24**(3): 437-446.
- Zeevalk, G. D. and W. J. Nicklas (1992). "Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg²⁺ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism." J Neurochem **59**(4): 1211-1220.
- Zhang, S. J., M. N. Steijaert, D. Lau, G. Schutz, C. Delucinge-Vivier, P. Descombes and H. Bading (2007). "Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death." Neuron **53**(4): 549-562.

Zheng, S., S. M. Eacker, S. J. Hong, R. M. Gronostajski, T. M. Dawson and V. L. Dawson (2010). "NMDA-induced neuronal survival is mediated through nuclear factor I-A in mice." J Clin Invest **120**(7): 2446-2456.

Zhou, Y. and N. C. Danbolt (2014). "Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain." J Neural Transm (Vienna) **121**(8): 799-817.

ANEXO 1

Nome em citações bibliográficas: OLMO, ISABELLA G.; OLMO, I. G; GUIMARAES, ISABELLA M.; GUIMARAES, I. M.

A.1.1 – Artigos publicados em periódicos – Primeira autoria

OLMO, ISABELLA G.; CARVALHO, TONIANA G.; COSTA, VIVIAN V.; ALVES-SILVA, JULIANA; FERRARI, CAROLINA Z.; IZIDORO-TOLEDO, TATIANE C.; DA SILVA, JULIANA F.; TEIXEIRA, ANTONIO L.; SOUZA, DANIELLE G.; MARQUES, JOAO T.; TEIXEIRA, MAURO M.; VIEIRA, LUCIENE B.; RIBEIRO, FABIOLA M. Zika Virus Promotes Neuronal Cell Death in a Non-Cell Autonomous Manner by Triggering the Release of Neurotoxic Factors. Frontiers in Immunology, v. 8, p. 1, 2017.

OLMO, I. G.; FERREIRA-VIEIRA, T. H.; RIBEIRO, F. M. Dissecting the Signaling Pathways Involved in the Crosstalk between Metabotropic Glutamate 5 and Cannabinoid Type 1 Receptors. Molecular Pharmacology, v. 90, p. 609-619, 2016.

GUIMARAES, ISABELLA M.; CARVALHO, TONIANA G; FERGUSON, STEPHEN SG; PEREIRA, GRACE S; RIBEIRO, FABIOLA M. The metabotropic glutamate receptor 5 role on motor behavior involves specific neural substrates. Molecular Brain, v. 8, p. 24, 2015.

A.1.2 – Artigos publicados em periódicos – Em colaboração

PEREIRA, LUCIANA M.; **GUIMARÃES, ISABELLA M.**; OLIVEIRA, VINÍCIUS E.M.; BASTOS, CRISTIANE P.; RIBEIRO, FABIOLA M.; PRADO, VÂNIA F.; PRADO, MARCO A.M.; PEREIRA, GRACE S. Estradiol effect on short-term object memory under hypocholinergic condition. BRAIN RESEARCH BULLETIN, v. 1, p. 1, 2018.

COSTA, VIVIAN V.; DEL SARTO, JULIANA L.; ROCHA, REBECA F.; SILVA, FLAVIA R.; DORIA, JULIANA G.; **OLMO, ISABELLA G.**; MARQUES, RAFAEL E.; QUEIROZ-JUNIOR, CELSO M.; FOUREAUX, GISELLE; ARAÚJO, JULIA MARIA S.; CRAMER, ALLYSSON; REAL, ANA LUÍZA C. V.; RIBEIRO, LUCAS S.; SARDI, SILVIA I.; FERREIRA, ANDERSON J.; MACHADO, FABIANA S.; DE OLIVEIRA, ANTÔNIO C.; TEIXEIRA, ANTÔNIO L.; NAKAYA, HELDER I.; SOUZA, DANIELLE G.; Ribeiro, Fabiola M. ; TEIXEIRA, MAURO M. . N -Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptor Blockade Prevents Neuronal Death Induced by Zika Virus Infection. mBio, v. 8, p. e00350-17, 2017.

SILVA, FLAVIA R.; MIRANDA, ARTUR S.; SANTOS, REBECA P.M.; **OLMO, ISABELLA G.**; ZAMPONI, GERALD W.; DOBRANSKY, TOMAS; CRUZ, JADER S.; VIEIRA, LUCIENE B.; Ribeiro, Fabiola M. N-type Ca^{2+} channels are affected by full-length mutant huntingtin expression in a mouse model of Huntington's disease. NEUROBIOLOGY OF AGING, v. 55, p. 1-10, 2017.

AREAL, LORENA B.; PEREIRA, LORRAINE P.; RIBEIRO, FABIOLA M.; **OLMO, ISABELLA G.**; MUNIZ, MARCELO R.; DO CARMO RODRIGUES, MARIA; COSTA, PATRIK F.; MARTINS-SILVA, CRISTINA; FERGUSON, STEPHEN S. G.; GUIMARÃES, DANIELA A. M.; PIRES, RITA G. W. Role of Dynein Axonemal Heavy Chain 6 Gene Expression as a Possible Biomarker for Huntington's Disease: A Translational Study. JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE, v. 1, p. 1, 2017.

DORIA, J.G.; DE SOUZA, J.M.; ANDRADE, J.N.; RODRIGUES, H.A.; **GUIMARAES, I.M.**; CARVALHO, T.G.; GUATIMOSIM, C.; DOBRANSKY, T.; RIBEIRO, F.M. The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPPB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease. NEUROBIOLOGY OF DISEASE, v. 73, p. 163-173, 2015.

RIBEIRO, FABIOLA M; HAMILTON, ALISON; DORIA, JULIANA G; **GUIMARAES, ISABELLA M**; CREGAN, SEAN P; FERGUSON, STEPHEN SG. Metabotropic glutamate receptor 5 as a potential therapeutic target in Huntington's disease. Expert Opinion on Therapeutic Targets, v. 1, p. 1-12, 2014.

RIBEIRO, F. M.; DEVRIES, R. A.; HAMILTON, A.; **GUIMARAES, I. M.**; CREGAN, S. P.; PIRES, R. G. W.; FERGUSON, S. S. G. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout promotes motor and biochemical alterations in a mouse model of Huntington's disease. HUMAN MOLECULAR GENETICS, v. 23, p. 2030-2042, 2013.

ANEXO 2

Nas páginas a seguir, segue o artigo científico completo referente a esta tese.



Zika Virus Promotes Neuronal Cell Death in a Non-Cell Autonomous Manner by Triggering the Release of Neurotoxic Factors

Isabella G. Olmo¹, Toniana G. Carvalho¹, Vivian V. Costa¹, Juliana Alves-Silva¹, Carolina Z. Ferrari², Tatiane C. Izidoro-Toledo¹, Juliana F. da Silva³, Antonio L. Teixeira⁴, Danielle G. Souza⁵, Joao T. Marques¹, Mauro M. Teixeira¹, Luciene B. Vieira² and Fabiola M. Ribeiro^{1*}

¹Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, ²Department of Pharmacology, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Brazil, ³Institute of Education and Research Santa Casa, Belo Horizonte, Brazil, ⁴Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Science, UT Health, Houston, TX, United States, ⁵Department of Microbiology, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Pavle R. Andjus,
University of Belgrade, Serbia

Reviewed by:

Svetlana Khaiboullina,
Whittemore Peterson Institute, United States

Cristina Martins Silva,
Federal University of Espírito Santo, Brazil

*Correspondence:

Fabiola M. Ribeiro
fmribeiro@icb.ufmg.br

Specialty section:

This article was submitted to Multiple Sclerosis and Neuroimmunology, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: 29 June 2017

Accepted: 08 August 2017

Published: 23 August 2017

Citation:

Olmo IG, Carvalho TG, Costa VV, Alves-Silva J, Ferrari CZ, Izidoro-Toledo TC, da Silva JF, Teixeira AL, Souza DG, Marques JT, Teixeira MM, Vieira LB and Ribeiro FM (2017) Zika Virus Promotes Neuronal Cell Death in a Non-Cell Autonomous Manner by Triggering the Release of Neurotoxic Factors. *Front. Immunol.* 8:1016. doi: 10.3389/fimmu.2017.01016

Zika virus (ZIKV) has recently caused a worldwide outbreak of infections associated with severe neurological complications, including microcephaly in infants born from infected mothers. ZIKV exhibits high neurotropism and promotes neuroinflammation and neuronal cell death. We have recently demonstrated that *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) blockade by memantine prevents ZIKV-induced neuronal cell death. Here, we show that ZIKV induces apoptosis in a non-cell autonomous manner, triggering cell death of uninfected neurons by releasing cytotoxic factors. Neuronal cultures infected with ZIKV exhibit increased levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and glutamate. Moreover, infected neurons exhibit increased expression of GluN2B and augmented intracellular Ca²⁺ concentration. Blockade of GluN2B-containing NMDAR by ifenprodil normalizes Ca²⁺ levels and rescues neuronal cell death. Notably, TNF- α and IL-1 β blockade decreases ZIKV-induced Ca²⁺ flux through GluN2B-containing NMDARs and reduces neuronal cell death, indicating that these cytokines might contribute to NMDAR sensitization and neurotoxicity. In addition, ZIKV-infected cultures treated with ifenprodil exhibits increased activation of the neuroprotective pathway including extracellular signal-regulated kinase and cAMP response element-binding protein, which may underlie ifenprodil-mediated neuroprotection. Together, our data shed some light on the neurotoxic mechanisms triggered by ZIKV and begin to elucidate how GluN2B-containing NMDAR blockade can prevent neurotoxicity.

Keywords: Zika virus, *N*-methyl-D-aspartate receptors, GluN2B, tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β

Abbreviations: BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CamKIV, calmodulin-dependent protein kinase IV; CREB, cAMP response element-binding protein; DIV, days *in vitro*; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GLS, glutaminase; GluN, *N*-methyl D-aspartate receptor subtype; HBSS, Hank's balanced salt solution; IL, interleukin; JEV, Japanese encephalitis virus; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; NeuN, neuronal marker; NMDAR, *N*-methyl-D-aspartate receptor; Rpl32, ribosomal protein L32; SLC1a, glutamate transporter; SLEV, Saint Louis encephalitis virus; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; WNV, West Nile virus; ZIKV, Zika virus.

INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus (arbovirus) from the *Flavivirus* genus within the *Flaviviridae* family that was first isolated in 1947 from a rhesus monkey in the Ziika forest in Uganda (1). Only 14 sporadic and benign cases of ZIKV infection were documented in humans prior to the first large epidemic outbreak, which took place on the Island of Yap in 2007 (2, 3). This was followed by a major ZIKV outbreak in the French Polynesia from October 2013 to April 2014 (4). Since 2015, 76 countries and territories around the world have reported mosquito-borne ZIKV transmission, triggering an ongoing epidemic in South America, where Brazil was the main affected country (5). These recent ZIKV outbreaks have been associated with severe neurological complications, including microcephaly and congenital neurological malformations in infants born from infected mothers (6–9), as well as Guillain-Barré syndrome in adults (10–12). As a consequence, in February 2016, the World Health Organization declared that the ZIKV outbreak was a public health emergency of international concern (13). ZIKV was detected in the placenta and amniotic fluid of two pregnant women whose fetuses had been diagnosed with microcephaly (14–16), indicating that ZIKV can cross the placental barrier. The virus has also been found in the brains and retinas of microcephalic fetuses (16–18). ZIKV exhibits high neurotropism and can promote neuroinflammation and neurodegeneration, which is the main correlate of ZIKV-associated neurological changes (17, 19–21).

We have recently demonstrated that *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) blockade by memantine could prevent ZIKV-induced cell death of primary cultured corticostriatal neurons (22). Type I interferon receptor-deficient mice (IFN α / β R $^{-/-}$) infected with ZIKV exhibited high levels of neurodegeneration, microgliosis, and inflammatory response (22). Importantly, treatment of ZIKV-infected IFN α / β R $^{-/-}$ mice with 30 mg/kg memantine was efficient to prevent microglia proliferation and neurodegeneration in all brain substrates tested, including prefrontal and motor cortex, striatum, and hippocampus (22). Moreover, memantine treatment was effective to prevent ZIKV-induced increase in total and differential blood leukocyte counts (22). Despite these very promising results, little is known on how ZIKV induces neurodegeneration and on how NMDAR blockade rescues ZIKV-induced neuronal cell loss.

In the present work, we examined whether the release of neurotoxins by ZIKV-infected cells could contribute to death of uninfected nearby neurons, triggering apoptosis in a non-cell autonomous manner. Neuronal cultures infected with ZIKV exhibited increased levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and glutamate. The increase in TNF- α and IL-1 β production facilitated NMDAR sensitization, thereby increasing Ca $^{2+}$ entry into the cell and promoting excitotoxicity. Blockade of GluN2B-containing NMDARs by ifenprodil decreased intracellular Ca $^{2+}$ concentration and rescued neuronal cell death. In addition, ZIKV-infected cultures treated with ifenprodil exhibited augmented activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and cAMP response element-binding protein (CREB), which may contribute to ifenprodil-mediated neuroprotection. Together, these data shed some light on the

neurotoxic mechanisms triggered by ZIKV and begin to elucidate how GluN2B-containing NMDAR blockade can prevent neurotoxicity.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Neurobasal medium, N2 and B27 supplements, GlutaMAX, penicillin and streptomycin, Live/Dead viability assay, TRIzolTM, Power SYBRTM Green PCR Master Mix, anti-rabbit Alexa Fluor 488 antibody, anti-mouse Alexa Fluor 546, and DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) were purchased from Thermo Fisher Scientific. (1R*, 2S*)-erythro-2-(4-Benzylpiperidino)-1-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol hemi-(DL)-tartrate (Ifenprodil) were purchased from Tocris Cookson Inc. Horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody was from BioRad. Western Blotting ECL Prime detection reagents were from GE Healthcare and Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate was from Millipore. Anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), anti-ERK1/2, and anti-phospho-CREB (Ser133) rabbit antibodies and anti-CREB mouse antibody were purchased from Cell Signaling. All other biochemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

Animals

C57BL/6 mice (25–30 g) were purchased from the animal facility (CEBIO) from the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Mice were housed in an animal care facility at 23°C on a 12-h light/12-h dark cycle with food and water provided *ad libitum*. This study was carried out in accordance with the recommendations of the Brazilian Government (law 11794/2008a) and approved by the Committee on Animal Ethics of the UFMG (CEUA/UFMG, permit protocol no. 242/2016).

Virus

A low-passage-number clinical isolate of ZIKV (HS-2015-BA-01), isolated from a viremic patient with symptomatic infection in Bahia State, Brazil, in 2015, was used. The complete genome of the virus is available at GenBank under the accession no. KX520666. Virus stocks were propagated in C6/36 *Aedes albopictus* cells and titrated as described previously (23).

Neuronal Primary Cultures Preparation

Neuronal cultures were prepared from the cerebral cortex and striatal regions of C57BL/6 wild-type mouse embryo brains, embryonic day 15 (E15). After dissection, the brain tissue was submitted to trypsin digestion followed by cell dissociation using a fire-polished Pasteur pipette. Neuronal cells were plated onto poly-L-ornithine-coated dishes in Neurobasal[®] medium supplemented with N2 and B27[®] supplements, 2 mM GlutaMAXTM, and penicillin and streptomycin (50 μ g/mL each), and cultured *in vitro* for 5 days at 37°C and 5% CO $_2$ in a humidified incubator.

Viral Infection and Neuronal Treatment

Primary neuronal cultures were incubated with either ZIKV (MOI of 0.1) or C6/36 supernatant (MOCK) for 1 h (adsorption

period). After that, residual virus was removed and replaced by supplemented neurobasal medium. Kinetic experiments evaluating the effects of ZIKV on primary neurons were performed after 12, 24, 36, 48, and 72 h of ZIKV infection. When MOCK- or ZIKV-infected neuronal cultures were treated with ifenprodil, etanercept, or IL1-RA, drugs were added immediately after viral infection and replenished every 24 h in experiments lasting between 36 and 72 h. Following this incubation, neuronal cultures were assessed for cell death/survival, glutamate release, and $[Ca^{2+}]_i$ quantitation, or processed for immunofluorescence, quantitative RT-PCR (RT-qPCR), and western blot analyses.

Cell Death Assay

Neuronal cells death was determined by *LIVE/DEAD Cell Viability Assays*, as previously described (24), at different time points after infection (as indicated in each *figure legend*). Briefly, MOCK- or ZIKV-infected neurons, submitted to different drug treatments, were stained with 2 μ M calcein acetoxymethyl ester (AM) and 2 μ M ethidium homodimer-1 for 15 min and the fractions of live (calcein AM positive) and dead (ethidium homodimer-1 positive) cells were determined. Neurons were visualized and imaged in a fluorescence microscope, *FLoid[®] Cell Imaging Station* (Thermo Scientific). A minimum of 150 cells were analyzed per well in triplicate using ImageJ software. Dead cells were expressed as a percentage of the total number of cells.

Glutamate Release Assay

Glutamate release by primary cultured neurons was measured indirectly by the fluorescence increase due to the production of NADPH in the presence of glutamate dehydrogenase type II and NADP⁺ (25). Neuronal cultures, challenged with ZIKV or MOCK for 48 h, were incubated with 1 mM CaCl₂ and 1 mM NADP⁺ in Hank's balanced salt solution (HBSS) and analyzed in a spectrofluorometer (Synergy 2, BioTek[®] Instruments, Inc.) using excitation wavelength of 360 nm and emission of 450 nm. Glutamate dehydrogenase (50 units per well) was added to each well after 5 min, and readings were restarted until the fluorescence reached balance (approximately 5 min). Calibration curves were carried out in parallel with the addition of known amounts of glutamate (5 nM/ μ L) to the reaction medium. Glutamate levels were normalized to the total amount of protein per well. Experimental data are expressed as percentage, taking basal glutamate release (time 0) as 100%. The experiments were performed at 37°C in triplicate well for each condition.

Measurement of Intracellular Ca²⁺ Concentration

Neuronal cultures, MOCK- or ZIKV-infected and submitted to different drug treatments, as described in the *Figure Legend*, were loaded with 0.2 μ M Fura-2 AM for 20 min at 37°C. Neurons were washed with HBSS and illuminated with alternating 340- and 380-nm light, with the 510 nm emission detected using a PTI spectrofluorimeter (Synergy 2, BioTek[®] Instruments, Inc.). At the end of each experiment, sodium 10% dodecyl sulfate (SDS) (0.1% final) was added to obtain R_{max} followed by 3 M

Tris + 400 mM EGTA (pH 8.6) for R_{min} . All experiments were performed in triplicate wells for each condition.

Immunoblotting

12 or 24 h following MOCK or ZIKV infection, neurons, treated or not with 0.01 μ M ifenprodil, were lysed in RIPA buffer (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.2, 0.05 M EDTA, 1% non-idet P40, 1% TritonX-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing SIGMAFAST[™] Protease Inhibitor Cocktail Tablets. 100 μ g of total cellular protein for each sample was subjected to SDS-PAGE, followed by electroblotting onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% BSA in wash buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.05% Tween 20) for 1 h and then incubated with either rabbit anti-phospho CREB (1:500) or rabbit anti-phospho ERK (Thr202/Thr204) (1:1,000) antibodies in wash buffer containing 3% BSA overnight at 4°C. Membranes were rinsed three times with wash buffer and then incubated with secondary peroxidase conjugated anti-rabbit IgG antibody diluted 1:5,000 in wash buffer containing 3% BSA for 1 h. Membranes were rinsed three times with wash buffer, incubated with ECL prime western blotting detection reagents, and scanned and analyzed by ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Antibodies were then stripped and membranes were incubated with either mouse anti-CREB (1:700) or rabbit anti-ERK1/2 (1:1,000) antibodies overnight at 4°C and probed with secondary anti-mouse IgG antibody diluted 1:2,500 or anti-rabbit IgG antibody 1:5,000 to determine total CREB and ERK1/2 expression, respectively. Non-saturated, immunoreactive CREB and ERK1/2 bands were quantified by scanning densitometry. Immuno-band intensity was calculated using ImageJ software, and the number of pixels of CREB and ERK1/2 phospho bands was divided by the number of pixels of total CREB and ERK1/2, respectively, to normalize phosphorylation levels of kinases to total kinase expression.

Measurement of Cytokine Concentrations (ELISA)

Cytokine concentration (IL-1 β and TNF- α) was measured in the supernatant of neuronal cultures at 12, 24, or 48 h following MOCK or ZIKV infection. Cytokine measurement was performed using commercially available antibodies and according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Briefly, 96-well plates were sensitized with capture antibody and incubated overnight. Plates were then washed and blocked with 200 μ L of 1% BSA solution for 60 min. After a second wash, 100 μ L of the standard curve (serially diluted) and each sample were added to wells in duplicate and a new incubation was performed on the plate shaker at agitation of 300 rpm, 37°C, for 2 h. Following a further wash, 100 μ L of the detection antibody was added and plates were re-incubated for 2 h. Between each wash, streptavidin was added for 20 min, followed by substrate o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD Sigma) addition for 30 min. Reaction was stopped by the addition of 100 μ L of the stop solution (H₂SO₄). The standard curve and samples were read in a

spectrophotometer at 490 nm. The detection limit of each kit is 4–8 pg/mL.

Immunofluorescence and Imaging

48 h following MOCK or ZIKV infection, neuronal cultures were washed twice in Phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 4% formaldehyde in PBS for 30 min. After fixation, cells were washed three times with PBS and permeabilized in PBS containing 0.3% Triton, for 20 min. Primary antibodies were diluted in permeabilization solution as follows: mouse anti-4G2 (1:300), mouse anti-NeuN (1:500), rabbit anti-active caspase 3 (1:500), and rabbit anti-Iba1 (1:500) and incubated overnight at 4°C. Cells were washed three times with PBS and incubated with goat anti-mouse conjugated with Alexa Fluor 546 and goat anti-rabbit conjugated with Alexa Fluor 488 antibodies (diluted 1:500 in permeabilization solution) for 60 min. NucBlue™ fixed cell stain was used to label nuclei with DAPI. Image acquisition was performed using a Zeiss LSM 880 confocal system equipped with a 40×/1.30 oil DIC M27 objective. Zen 2 software was used to adjust the settings for wavelength detection of immunolabeled proteins as follows: DAPI was imaged by detection between 410 and 496 nm, Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor-labeled antibodies were detected between 499–555 and 560–679 nm, respectively. Sequential excitation of fluorophores was performed using 405, 488, and 532 nm lasers for DAPI, Alexa Fluor 488, and Alexa Fluor 546, respectively.

Quantitative RT-qPCR

RNA was isolated using TRIzol™ reagent as per the manufacturer's instructions (Thermo Scientific). RNA was resuspended in 15 µL of nuclease-free water, and its concentration was analyzed by spectrophotometer (NanoDrop™, Thermo Scientific). cDNAs were prepared from 2 µg of total RNA extracted in a 20-µL final reverse transcription reaction. RT-qPCR was performed from 10× diluted cDNA and using Power SYBR™ Green PCR Master Mix in the QuantStudio™ 7 Flex real-time PCR system platform (Applied Biosystems). All RT-qPCR assays were performed to detect viral RNA and quantify mRNA levels of the following genes: mus musculus tumor necrosis factor (*Tnf-α*); mus musculus interleukin 1 beta (*Il1β*); mus musculus glutaminase (*Gls*); mus musculus solute carrier family 1 (glial high-affinity glutamate transporter) (*Slc1a2*); mus musculus glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (*Grin2b*); ZIKV RNA—genome reference available at GenBank: KX197192.1; and mus musculus ribosomal protein L32 (*Rpl32*). Primers were designed using Primer3Plus Program (26): *Tnfa* (forward: 5'-GCTGAGCTCAAACCCTGGTA-3'; reverse: 5'-CG GACTCCGCAAAGTCTAAG-3'); *Il1β* (forward: 5'-GGCCTCA AAGGAAAGAATC-3'; reverse: 5'-TACCAGTTGGGGAATC TGC-3'); *Gls* (forward: 5'-GGCAAAGGCATTCTATTGGA-3'; reverse: 5'-TTGGCTCCTTCCCAACATAG-3'); *Slc1a2* (forward: 5'-ATTGGTGCAGCCAGTATTCC-3'; reverse: 5'-CCAGCTCA GACTTGAAAGG-3'); *Grin2b* (forward: 5'-GTGAGAGCTCC TTTGCCAAC-3'; reverse: 5'-ATGAAAGGGTTTTCGCTGAC-3'); ZIKV (forward: 5'-TCAAACGAATGGCAGTCAGTG-3'; reverse: 5'-GCTTGTGAAGTGGTGGGAG-3'); and *Rpl32* (forward: 5'-GCTGCCATCTGTTTACGG-3'; reverse: 5'-TGAC

TGGTGCCTGATGAACT-3'). Previous verification of undesired secondary formations or dimers between primers were performed using “OligoAnalyser 3.1” tool (Integrated DNA Technologies©), available at <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>. All primers used in this work were validated by serial dilution assay and the reaction efficiency was calculated, comprising 90–110% (data not shown). All RT-qPCRs showed good quality of amplification and changes in gene expression were determined with the $2^{-\Delta Ct}$ method using *Rpl32* for normalization.

Data Analysis

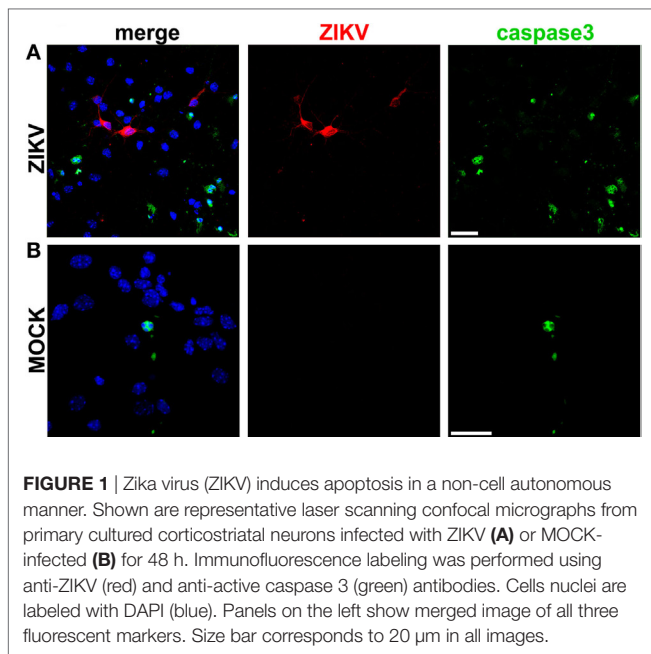
Means ± SEM are shown for the number of independent experiments indicated in *Figure Legends*. GraphPad Prism™ software was used to analyze data for statistical significance determined by either unpaired *t*-test (for comparing two groups) or one-way or two-way analysis of variance testing followed by Bonferroni *post hoc* multiple comparison testing.

RESULTS

To investigate the mechanism underlying ZIKV-induced neuronal cell death, we employed primary neuronal cell cultures from the corticostriatal region of mouse embryo brains. Over 99.5% (1,030 out of 1,035) of these cells consisted of neurons, as they were positive for the neuronal marker NeuN (Figure S1A in Supplementary Material). Only 5 out of 846 of the analyzed cells ($0.5 \pm 0.22\%$) were positively labeled for Iba1 (Figure S1B in Supplementary Material), a microglia marker. Moreover, ZIKV infection did not increase the number of microglia cells ($0.5 \pm 0.23\%$) and no microglia infected with ZIKV was found in these cultures. There was no cell positive for glial fibrillary acidic protein (Figure S1C in Supplementary Material), an astrocyte marker. Therefore, the primary cell cultures employed here can be regarded as pure neuronal cultures.

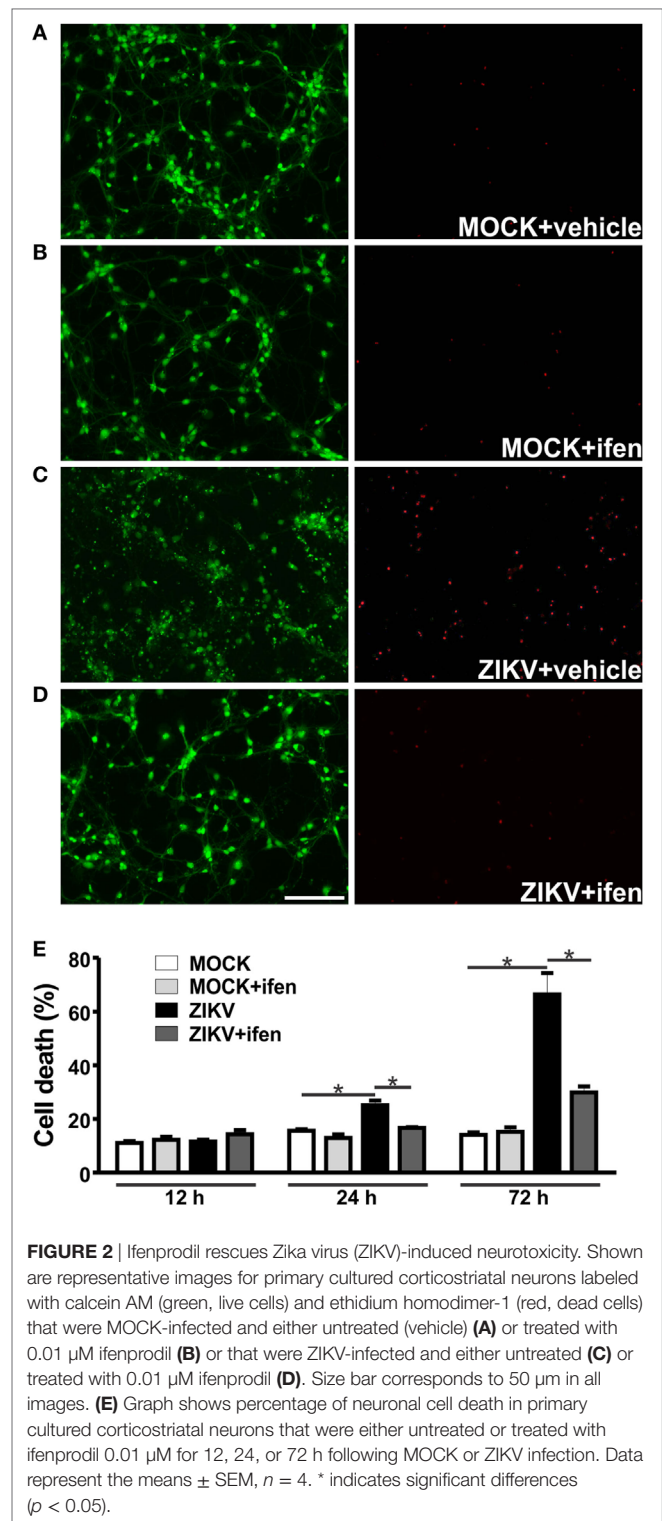
Primary neuronal cultures were then infected with a Brazilian isolate of ZIKV, ZIKV HS-2015-BA-01 strain. Control cultures were MOCK-infected using supernatant cultured medium from a suspension of mosquito C6/36 *A. Albopictus*-cultured cells. Forty-eight hours following infection, primary neurons were immunolabeled using specific antibodies for either ZIKV or active caspase 3. Approximately one third ($28.0 \pm 2.35\%$) of the cells present in the ZIKV-infected cultures were positive for the active form of caspase 3 (Figure 1A), compared to only $11.51 \pm 1.43\%$ of the cells in the MOCK-infected culture (Figure 1B), indicating that ZIKV infection triggers apoptosis. Interestingly, although several neurons were positive for ZIKV, we identified only 1 cell positive for ZIKV among the 228 cells positive for caspase 3. In fact, most ZIKV-positive neurons were surrounded by caspase 3-labeled neurons that appeared not to be infected by the virus (Figure 1A). These data indicate that ZIKV might trigger apoptosis mostly in a non-cell autonomous manner. Thus, we hypothesize that ZIKV-infected neurons may release pro-apoptotic factors that could trigger cell death of nearby neuronal cells.

We have previously demonstrated that ZIKV leads to high levels of neuronal cell death (22). Corroborating our previous results, ZIKV-infected neurons exhibited high levels of



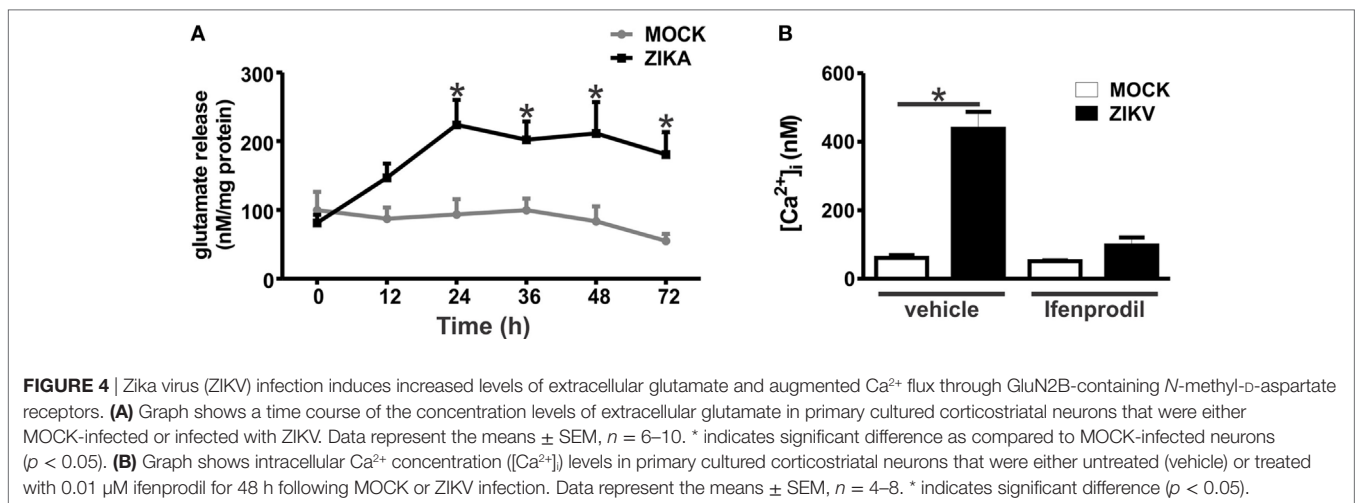
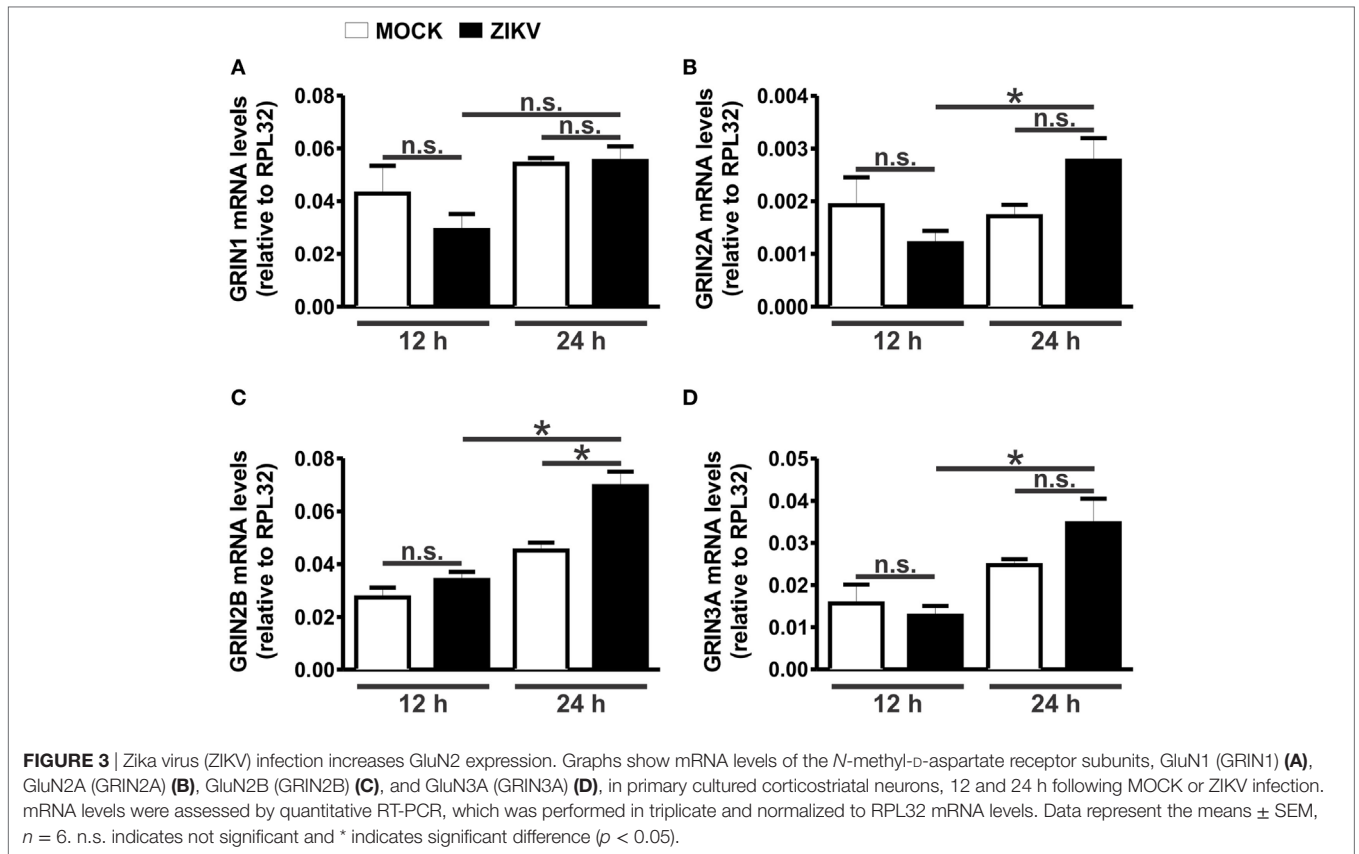
neuronal cell death 72 h following virus infection, as compared to that of MOCK-infected cells (**Figure 2**). To investigate early events that could be responsible for ZIKV-mediated neuronal cell death, we analyzed neurons at 12 and 24 h following virus infection. High levels of ZIKV RNA were present at 12 and 24 h following virus infection (Figure S2 in Supplementary Material). However, neuronal cell death levels higher than that of MOCK-infected neurons could only be observed at 24 h after ZIKV infection (**Figure 2E**). Therefore, 12 h following ZIKV infection represents a time point without overt neuronal cell death. We have recently demonstrated that NMDAR blockade abrogates ZIKV-induced neuronal cell death (22). In agreement with these results, GluN2B containing NMDAR blockade by 0.01 μ M ifenprodil abolished ZIKV-triggered neuronal cell death at 24 and 72 h following virus infection (**Figure 2**).

To further explore the role of NMDARs in ZIKV-mediated neuronal cell death, we first evaluated the expression levels of different subunits of NMDARs at 12 and 24 h following virus infection. NMDARs are heterotetramers consisting of two obligatory GluN1 subunits and two additional GluN2 or GluN3 subunits (27). ZIKV infection did not alter the levels of GluN1 (**Figure 3A**), GluN2A (**Figure 3B**), and GluN3A (**Figure 3D**) mRNAs, as compared to MOCK-infected cultures. Although a strong tendency toward an increase in the expression of GluN2A (**Figure 3B**) and GluN3A (**Figure 3D**) was observed 24 h after ZIKV infection, no significant statistical difference was found when comparing to MOCK-infected controls. In addition, GluN2B expression levels were not increased 12 h following ZIKV infection, as compared to MOCK-infected controls (**Figure 3C**). However, ZIKV-infected cultures exhibited increased expression of GluN2A (**Figure 3B**), GluN2B (**Figure 3C**) and GluN3A (**Figure 3D**) at 24 h following infection, as compared to that of 12 h following virus infection. Moreover, at 24 h following ZIKV infection, GluN2B mRNA levels were significantly increased, as



compared to that of MOCK (**Figure 3C**). These data further support the concept that blockade of GluN2B-containing NMDARs may offer a good therapeutic strategy to prevent ZIKV-mediated neuronal cell death.

Our next step was to determine whether glutamate levels were increased in ZIKV-infected cultures, which could contribute



to NMDAR overactivation and, thus, neuronal cell death. Glutamate levels were increased in ZIKV-infected cultures, as compared to that of MOCK-treated cultures (Figure 4A). Although glutamate levels appeared already higher at 12 h following ZIKV infection, a significant difference was only observed at 24 h and at later time points (Figure 4A). Therefore, increased glutamate levels could account for increased NMDAR activation. Overactivation of NMDARs can lead to excitotoxicity due to increased intracellular Ca²⁺ entry into the cell (28).

As GluN2B expression and glutamate levels were increased due to ZIKV infection, we investigated whether Ca²⁺ levels were also augmented in ZIKV-infected neuronal cultures. Neuronal cultures infected with ZIKV exhibited high levels of intracellular Ca²⁺ when compared to MOCK-infected cultures (Figure 4B). Moreover, treatment with 0.01 μM ifenprodil was efficient to completely rescue this increase in intracellular Ca²⁺ levels exhibited by ZIKV-infected cultures (Figure 4B), indicating that GluN2B-containing NMDARs are the main channels

responsible for the increase in Ca^{2+} entry triggered by ZIKV infection.

Tumor necrosis factor- α can increase the expression of glutaminase, the enzyme responsible for glutamate synthesis (29, 30). Moreover, both IL-1 β and TNF- α can decrease the reuptake of glutamate, thus increasing the extracellular levels of glutamate (31, 32). In addition, both TNF- α and IL-1 β can sensitize NMDARs, increasing Ca^{2+} entry and, thus, excitotoxicity (33, 34). In this context, we decided to investigate whether the levels of TNF- α and IL-1 β were increased in ZIKV-infected neuronal primary cultures. TNF- α mRNA levels were increased in neurons infected for 12 and 24 h with ZIKV, as compared to that

of MOCK-infected cultures (Figure 5A). TNF- α protein levels were also elevated in the supernatant of cultures infected with ZIKV for 24 and 48 h, as compared to that of MOCK cultures (Figure 5B). In addition, IL-1 β mRNA levels were increased 12 h after virus infection (Figure 5C). However, IL-1 β protein levels were not detected by ELISA. Our next step was to determine whether this modest neuronal-derived increase in IL-1 β and TNF- α production was sufficient to facilitate neuronal cell death. To address that, TNF- α and IL-1 β receptor were blocked with etanercept and IL-1RA, respectively, and ZIKV-induced neuronal cell death was measured. Etanercept treatment at all tested concentrations (0.1, 1, and 10 μ g/mL) led to a decrease

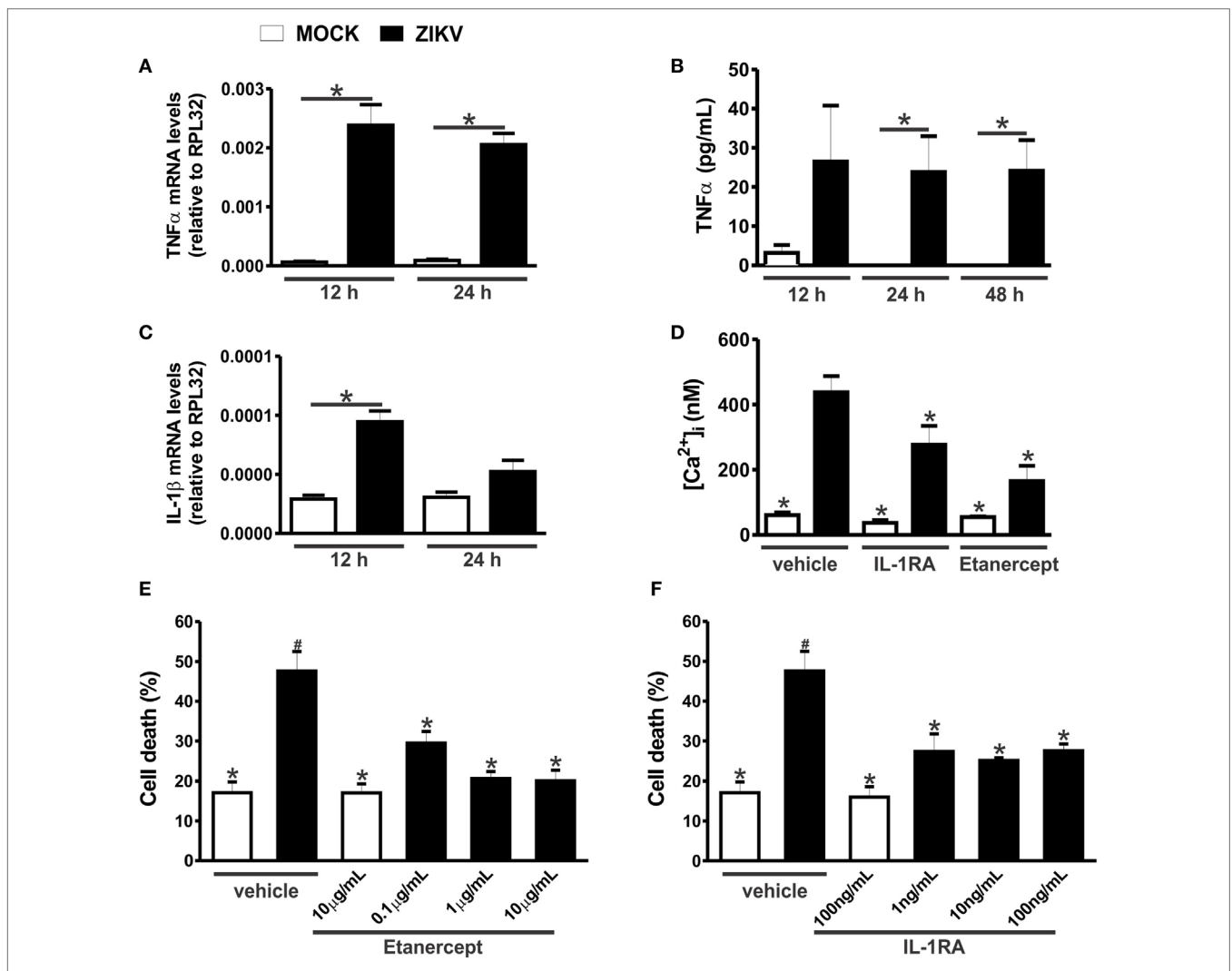


FIGURE 5 | Zika virus (ZIKV) infection induces tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) expression, facilitating excitotoxicity. Graphs show mRNA (A) and protein (B) levels of TNF- α and mRNA levels of IL-1 β (C), in primary cultured corticostriatal neurons, 12 and 24 h following MOCK or ZIKV infection. mRNA levels were assessed by quantitative RT-PCR, which was performed in triplicate and normalized to RPL32 mRNA levels, and protein levels were assessed by ELISA assay. Data represent the means \pm SEM, $n = 6-8$. * indicates significant differences ($p < 0.05$). (D) Graph shows intracellular $Ca^{2+}i$ levels in primary cultured corticostriatal neurons that were either untreated (vehicle) or treated with 10 ng/mL IL-1RA or 1 μ g/mL etanercept for 48 h following MOCK or ZIKV infection. Data represent the means \pm SEM, $n = 5-8$. * indicates significant differences as compared to ZIKV infected neurons ($p < 0.05$). Graphs show percentage of neuronal cell death in primary cultured corticostriatal neurons that were either untreated (vehicle) or treated with IL-1RA 1, 10, or 100 ng/mL (E) or etanercept 0.1, 1, or 10 μ g/mL (F) for 48 h following MOCK or ZIKV infection. Data represent the means \pm SEM, $n = 4-5$. * indicates significant differences as compared to ZIKV-infected neurons and # indicates significant differences as compared to MOCK-infected neurons ($p < 0.05$).

in ZIKV-induced neuronal cell death (**Figure 5E**). IL-1 β receptor blockade by IL-1RA also decreased neuronal cell death at all tested concentrations (1, 10, and 100 ng/mL) (**Figure 5F**). Importantly, neuronal cell death levels of ZIKV-infected cultures in the presence of either etanercept (**Figure 5E**) or IL-1RA (**Figure 5F**) were not different than that of MOCK-infected cultures. These data clearly demonstrate the importance of these inflammatory cytokines in the neuronal cell death mechanism triggered by ZIKV. Next, we tested whether TNF- α and IL-1 β could contribute to increased glutamate levels by increasing glutaminase and decreasing glutamate transporter (SLC1a) mRNA levels in neurons. No statistical difference was observed when comparing MOCK- and ZIKV-infected cultures in terms of glutaminase expression (Figure S3A in Supplementary Material). Contrary to our hypothesis, SLC1a expression levels were increased in neuronal cultures 24 h after ZIKV infection, what could constitute a protective mechanism to avoid further increases in extracellular glutamate levels (Figure S3B in Supplementary Material). Our next step was to investigate whether TNF- α and IL-1 β could be facilitating NMDAR sensitization. ZIKV infection enhanced intracellular Ca²⁺ levels and this enhancement was completely blocked by ifenprodil, indicating that increased intracellular Ca²⁺ levels was primarily due to Ca²⁺ flux through GluN2B-containing NMDARs (**Figure 4B**). To determine whether TNF- α and IL-1 β were contributing for NMDAR sensitization, we blocked TNF- α and IL-1 β receptor using 1 μ g/mL etanercept and 10 ng/mL IL-1RA, respectively, and evaluated intracellular Ca²⁺ levels. In agreement with our hypothesis, either TNF- α or IL-1 β blockade was efficient to decrease intracellular Ca²⁺ levels (**Figure 5D**). These data suggest that TNF- α and IL-1 β production triggered by ZIKV was effective to sensitize NMDARs, leading to increased Ca²⁺ entry and excitotoxicity.

To further understand the neuroprotective mechanism underlying GluN2B-containing NMDARs blockade, we investigated which cell survival signaling pathways were activated by ZIKV infection. Ifenprodil normalized the increased levels of intracellular Ca²⁺ triggered by ZIKV, which could greatly contribute to neuroprotection (**Figure 4B**). However, the neuroprotective pathway comprising ERK and CREB can be stimulated by glutamate receptors other than GluN2B-containing NMDARs (35). For instance, as ifenprodil only blocks GluN2B-containing NMDARs, glutamate could still activate GluN2A-containing NMDARs, which are predominantly synaptic NMDARs that were shown to promote neuronal survival *via* CREB/brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling (36). As ZIKV-infected cultures exhibited high levels of extracellular glutamate (**Figure 4A**), we decided to investigate whether the levels of phosphorylation/activation of ERK and CREB were altered by ZIKV infection and 0.01 μ M ifenprodil treatment. No difference was observed when comparing the activation of ERK and CREB in MOCK- and ZIKV-infected cultures at 12 h after virus infection (**Figures 6A,C**). However, 24 h following infection, ERK activation was increased in neurons that were infected with ZIKV and treated with ifenprodil, as compared to that of MOCK-infected cultures (**Figure 6B**). ZIKV infection, in

the presence or absence of ifenprodil treatment, increased CREB phosphorylation, as compared to MOCK (**Figure 6D**). Moreover, ifenprodil treatment in the absence of ZIKV was also efficient to activate CREB (**Figure 6D**). CREB can be activated *via* NMDARs through cell signaling pathways other than ERK, which could account for the ERK-independent activation of CREB observed in our experiments (37). Altogether, these data indicate that the cell survival signaling pathway downstream from NMDARs ERK/CREB is activated following ZIKV infection and GluN2B-containing NMDAR blockade.

DISCUSSION

ZIKV Induces Neuronal Apoptosis in a Non-Cell Autonomous Manner

Several flaviviruses, including Saint Louis encephalitis virus (38), Japanese encephalitis virus (JEV) (39, 40), and West Nile virus (WNV) (41), have been shown to induce neuronal apoptosis, an effect that appears to contribute to the neurological damage caused by these viruses. Virus-triggered neuronal apoptosis can be immune-mediated or induced by virus cell autonomous injury. For instance, flaviviruses can promote neuronal injury by altering the expression of pro- and anti-apoptotic proteins, thus, facilitating death of infected cells (39, 40, 42). It has been shown that primary cultured cortical neurons infected with WNV undergo apoptosis and that 96% of cells that were caspase 3 positive were also positive for WNV (41). These results are different from the data obtained in our study, as the great majority of neurons that were positive for caspase 3 were negative for ZIKV. Thus, the cell response triggered by ZIKV might differ from other flaviviruses. Previous studies have demonstrated that ZIKV induces apoptosis of human neural progenitor cells (19, 20, 43–45). Although the number of cells that were positive for both caspase 3 and ZIKV was not determined, it is possible to notice that several cells that were positive for ZIKV were not positive for caspase 3 in these studies (43, 45). Another study has shown that brain slices obtained from mice subjected to intracranial injection of ZIKV exhibits only a few cells positive for both caspase 3 and ZIKV (44), which corroborates our data showing that ZIKV induces apoptosis mostly through a non-cell autonomous mechanism. In this context, ZIKV will be able to efficiently replicate in infected neurons, increasing viral load, and otherwise healthy neurons will undergo apoptosis, exacerbating neurodegeneration. However, at this point, it is still unclear why ZIKV infected cells could be protected from apoptosis. It has been demonstrated that ZIKV infection upregulates PRPF8, which is a splicing factor known to have an anti-apoptotic effect in neurons infected with Picornavirus (46). Thus, ZIKV could protect infected neurons by altering the expression of apoptotic factors.

ZIKV Induction of TNF- α and IL-1 β Production by Neurons

Most encephalitic viruses induce production of inflammatory factors by glial cells. For example, JEV can infect both neuronal and glial cells, promoting the release of inflammatory factors,

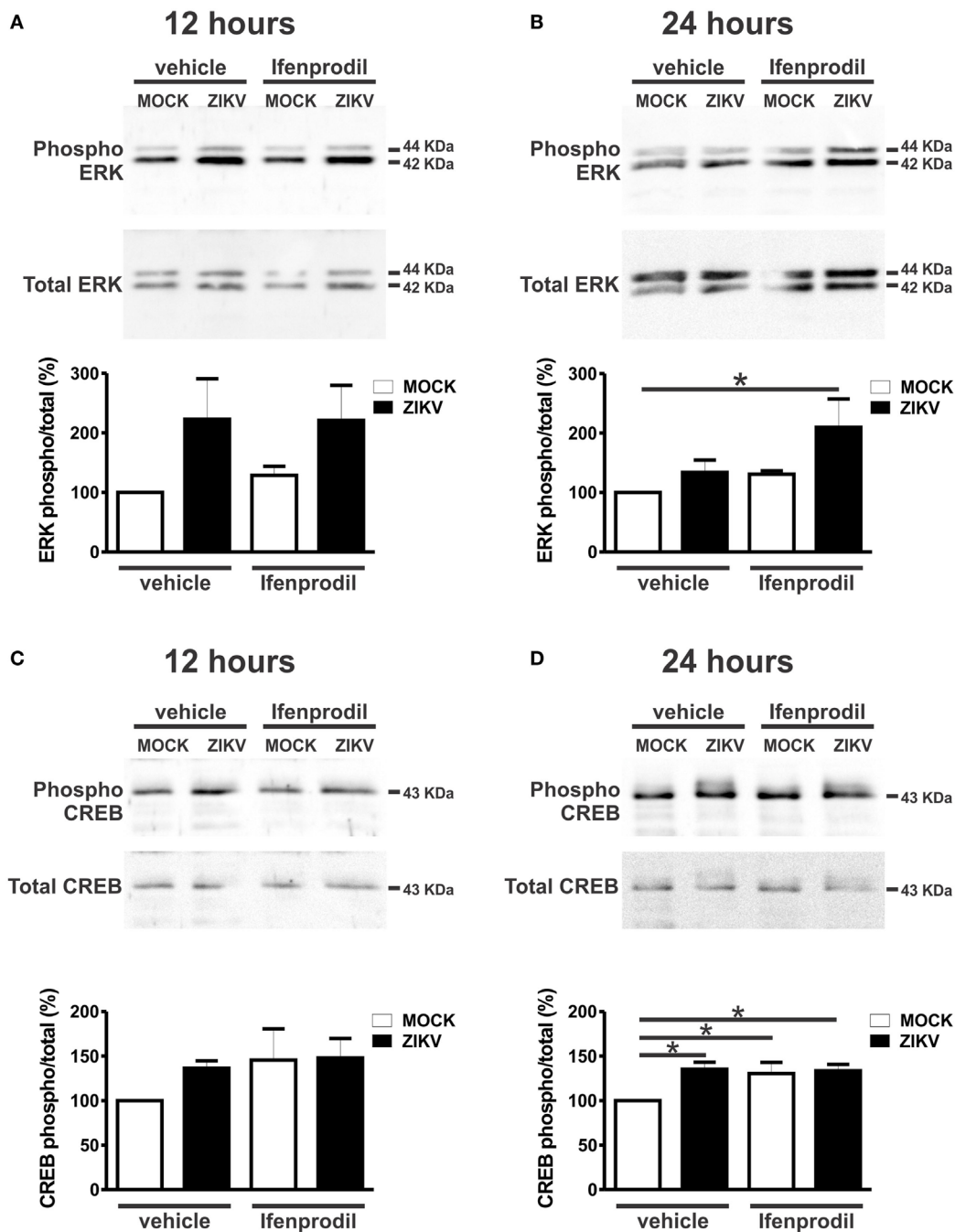


FIGURE 6 | Ifenprodil treatment of Zika virus (ZIKV)-infected cultures lead to increased extracellular signal-regulated kinase (ERK) and cAMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation. Shown are representative immunoblots for phospho- (upper panel) and total-ERK expression (lower panel) and graphs depicting the densitometric analysis of phospho-ERK normalized to total-ERK expression in primary cultured corticostriatal neurons that were either untreated (vehicle) or treated with 0.01 μ M ifenprodil for 12 (A) or 24 (B) hours following MOCK or ZIKV infection. 100 μ g of cell lysate was used for each sample. Data represent the means \pm SEM, $n = 5-6$. * indicates significant difference ($p < 0.05$). Shown are representative immunoblots for phospho- (upper panel) and total CREB expression (lower panel) and graphs depicting the densitometric analysis of phospho-CREB normalized to total CREB expression in primary cultured corticostriatal neurons that were either untreated (vehicle) or treated with 0.01 μ M ifenprodil for 12 (C) or 24 (D) hours following MOCK or ZIKV infection. 100 μ g of cell lysate was used for each sample. Data represent the means \pm SEM, $n = 4-6$. * indicates significant differences ($p < 0.05$).

including TNF α and IL-1 β , and glutamate by microglia (30). ZIKV is able to infect microglia as the virus was detected in microglia obtained from human fetal brain tissue (47).

Importantly, ZIKV-infected microglia exhibits increased expression levels of several chemokines and cytokines, including IL-6, TNF- α , IL-1 β , and monocyte chemoattractant protein 1

(47). We have identified TNF- α and IL-1 β as important factors triggering ZIKV-induced neuronal cell death. Interestingly, even though ZIKV induced only a mild increase in TNF- α and IL-1 β production by neuronal cultures, this increase was enough to sensitize NMDARs and facilitate neuronal cell death. Although astrocytes and neurons can produce TNF- α , the major source of this cytokine is microglia. However, in certain specific situations, neurons can also increase TNF- α production (48, 49). For example, WNV induces the expression of IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α by neuronal cells and

these neuron-derived cytokines can mediate the activation of astrocytes and contribute to WNV-induced neurotoxicity (50). Thus, it is possible that ZIKV infection could activate neuronal production of TNF α and IL-1 β . We also have to consider that the microglia present in our neuronal cultures might contribute to the production of these cytokines. However, this seems rather unlikely as the number of microglia was very small (~0.5%) and was not increased due to ZIKV infection. Future studies will be important to determine the role of different brain cell types in ZIKV-induced neuroinflammation.

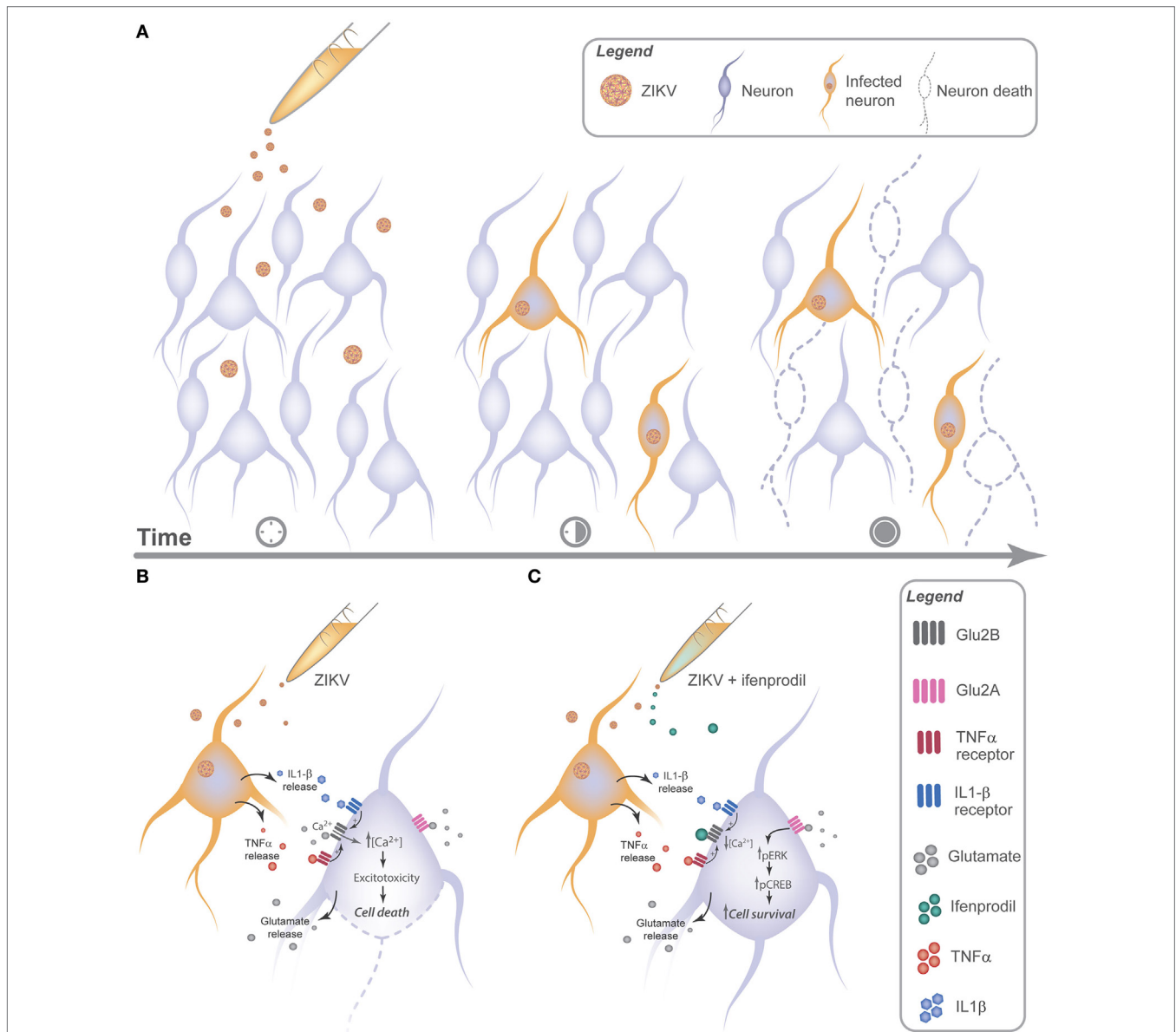


FIGURE 7 | Zika virus (ZIKV) promotes neuronal cell death via GluN2B activation in a non-cell autonomous manner by releasing neurotoxic factors. **(A)** ZIKV can be detected as early as 12 h following viral infection. 24 h later, cell injury can be observed in uninfected neurons nearby infected cells, indicating a cross talk between infected and uninfected neurons. **(B)** Neuronal cultures infected with ZIKV release glutamate and cytokines, triggering GluN2B-containing *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) sensitization and increasing the influx of extracellular Ca²⁺, which facilitates excitotoxicity. **(C)** Ifenprodil treatment of ZIKV-infected cultures reduces viral-mediated increased Ca²⁺ flux through GluN2B-containing NMDARs. Activation of GluN2A-containing NMDARs by glutamate in the presence of ifenprodil leads to ERK and CREB activation, which can increase the expression of genes important for neuronal survival.

TNF- α and IL- β Sensitize NMDAR and Trigger Neuronal Cell Death

Our results show that TNF- α and IL-1 β appeared to be key players of ZIKV-induced neuronal cell death. It has been previously demonstrated that these inflammatory cytokines potentiate excitotoxicity (51). For instance, IL-1 β can increase Ca²⁺ flux through NMDARs (34). The mechanism underlying NMDAR sensitization by IL-1 β involves the phosphorylation of NMDAR subunits GluN2A/B by Src tyrosine kinase (34). TNF- α can also sensitize NMDARs, increasing NMDAR-dependent Ca²⁺ entry and facilitating neurotoxicity (33). Moreover, it has also been shown that TNF- α can increase the localization of ionotropic glutamate receptors, including NMDARs, to synapses (52). Our results demonstrate that ZIKV infection augments Ca²⁺ flux through NMDARs, as GluN2B-containing NMDAR blockade by ifenprodil completely abolished the increase in intracellular Ca²⁺ levels. Importantly, ZIKV infection increased IL-1 β and TNF- α expression levels and blockade of these cytokines decreased Ca²⁺ influx and neuronal cell death. These results strongly indicate that IL-1 β and TNF- α are sensitizing NMDARs and facilitating ZIKV-induced excitotoxicity. Damaged or dying brain cells release high levels of glutamate (53), which could underlie the increase in glutamate levels and contribute for neuronal cell death propagation in a non-cell autonomous way (Figure 7).

We show here that GluN2B expression is increased in cultures infected with ZIKV. At this point, it is unclear why the expression of this NMDAR subunit is augmented. However, it has been demonstrated that TNF- α increases GluN1 expression (54) and that IL-1 β increases de expression of GluN2A/B (55). Thus, it is possible that IL-1 β could contribute to the observed increased expression of GluN2B. Although so far it is not clear what is the mechanism contributing for ZIKV-mediated increase in GluN2B expression, our data clearly show that GluN2B-containing NMDAR is a relevant pharmacological target to treat ZIKV-mediated neurotoxicity.

NMDAR Dual Role in Cell Survival and Neurodegeneration

Our results clearly demonstrate that blockade of GluN2B-containing NMDARs by ifenprodil leads to neuroprotection against ZIKV infection. Numerous studies indicate that GluN2A mediates the protective pathway and GluN2B contributes to the excitotoxic pathway (27, 56–59). NMDARs can be localized at either the synaptic or extrasynaptic region, and a few years ago, it was proposed that signaling resulting from synaptic and extrasynaptic NMDAR stimulation is linked to neuronal survival and death, respectively (36). It is generally thought that most GluN2A-containing NMDARs are synaptic whereas GluN2B-containing NMDARs are extrasynaptic (59–63). However, synaptic/extrasynaptic distribution of NMDARs is not a clear-cut spatial demarcation, as GluN2A subunits have been found at extrasynaptic sites and GluN2B at the synaptic region (27, 64, 65). Synaptic NMDARs are in general transiently and intensely activated by the trans-synaptic release of glutamate, while extrasynaptic NMDARs are more commonly activated by chronic exposure to high levels of glutamate. Importantly, our

results indicated that ZIKV infection led to sustained high levels of extracellular glutamate in the culture, which could underlie the activation of extrasynaptic NMDARs. Corroborating this hypothesis, ifenprodil rescued ZIKV-induced neuronal cell death.

Ca²⁺ influx evoked by the activation of synaptic NMDAR is well tolerated by neurons and can trigger the activation of CREB, which increases the expression of genes important for neuronal survival, including BDNF (36, 57, 66). In sharp contrast, comparable Ca²⁺ transients induced by activation of extrasynaptic NMDARs trigger a CREB shut-off pathway and mitochondrial membrane potential dysfunction, leading to neuronal cell death (36). In addition to BDNF, CREB targets genes that are important for reducing apoptosis by rendering mitochondria more resistant to cellular stress and toxic insults (67–70). Activation of CREB by NMDARs can occur *via* ERK and synaptic NMDAR stimulation promotes sustained ERK activity, whereas activation of all NMDARs by bath application of glutamate results in ERK activation that is followed by rapid inactivation (71–75). In agreement with these studies, we did not observe ERK activation when cultures were infected with ZIKV and glutamate levels were high, although an increase in ERK activation was observed when ifenprodil was added to ZIKV-infected cultures. Therefore, it is possible that GluN2B-containing NMDAR blockade decreased ERK inactivation allowing this kinase to phosphorylate its downstream targets, including CREB. However, we observed activation of CREB in ZIKV-infected cultures, regardless of ifenprodil treatment. This is probably because CREB can be activated by kinases other than ERK. For example, it has been shown that synaptic NMDAR stimulation can lead to activation of the calmodulin-dependent protein kinase IV, which promotes rapid activation of CREB, as opposed to the slower acting and long-lasting effects produced by ERK (76). Therefore, the results presented here corroborate previous studies and indicate that the increase in glutamate triggered by ZIKV may not necessarily lead to NMDAR-mediated cell death, as long as GluN2B-containing NDMARs are blocked.

CONCLUSION

Zika virus induces neuronal cell death in a non-cell autonomous manner by triggering the release of cytokines, including TNF- α and IL-1 β . Increased levels of TNF- α , IL-1 β , and glutamate overactivates NMDARs, promoting excitotoxicity and, consequently, neuronal cell death (Figure 7). Therefore, these results help to clarify the neurotoxic mechanisms elicited by ZIKV neuronal infection.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Brazilian Government (law 11794/2008a) and approved by the Committee on Animal Ethics of the UFMG (CEUA/UFMG, permit protocol no. 242/2016).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IO and FR designed the study, interpreted the data, and wrote the manuscript. IO, TC, VC, JA-S, CE, TI-T, JS, and LV performed the

acquisition, analysis, and interpretation of the data. JM, AT, DS, MT, and LV substantially contributed to the conception of the work and revised it critically for important intellectual content. All the authors approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Roenick P. Olmo for his insightful comments and suggestions on RT-qPCR primers and figure design.

REFERENCES

- Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1952) 46:509–20. doi:10.1016/0035-9203(52)90042-4
- Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun* (2016) 68:1–13. doi:10.1016/j.jaut.2016.02.006
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* (2009) 360:2536–43. doi:10.1056/NEJMoa0805715
- Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* (2014) 20:1085–6. doi:10.3201/eid2006.140138
- Petersen E, Wilson ME, Touch S, McCloskey B, Mwaba P, Bates M, et al. Rapid spread of Zika virus in the Americas – implications for public health preparedness for mass gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. *Int J Infect Dis* (2016) 44:11–5. doi:10.1016/j.ijid.2016.02.001
- de Araujo TV, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda-Filho D, Montarroyos UR, de Melo AP, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis* (2016) 16:1356–63. doi:10.1016/S1473-3099(16)30318-8
- Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med* (2016) 375:2321–34. doi:10.1056/NEJMoa1602412
- Cuevas EL, Tong VT, Rozo N, Valencia D, Pacheco O, Gilboa SM, et al. Preliminary report of microcephaly potentially associated with Zika virus infection during pregnancy – Colombia, January–November 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2016) 65:1409–13. doi:10.15585/mmwr.mm6549e1
- Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, Dub T, Guillemette-Artur P, Eyrolle-Guignot D, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *Lancet* (2016) 387:2125–32. doi:10.1016/S0140-6736(16)00651-6
- Dos Santos T, Rodriguez A, Almiron M, Sanhueza A, Ramon P, de Oliveira WK, et al. Zika virus and the Guillain-Barre syndrome – case series from seven countries. *N Engl J Med* (2016) 375:1598–601. doi:10.1056/NEJMc1609015
- Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barre syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* (2016) 387:1531–9. doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6
- Krauer F, Riesen M, Reveiz L, Oladapo OT, Martinez-Vega R, Porgo TV, et al. Zika virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain-Barre syndrome: systematic review. *PLoS Med* (2017) 14:e1002203. doi:10.1371/journal.pmed.1002203
- Gulland A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *BMJ* (2016) 352:i657. doi:10.1136/bmj.i657
- Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, do Rosario MS, Costa F, Archanjo G, et al. Zika virus infection and stillbirths: a case of hydrops fetalis, hydranencephaly and fetal demise. *PLoS Negl Trop Dis* (2016) 10:e0004517. doi:10.1371/journal.pntd.0004517
- Calvet G, Aguiar RS, Melo AS, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* (2016) 16:653–60. doi:10.1016/S1473-3099(16)00095-5
- Martines RB, Bhatnagar J, Keating MK, Silva-Flannery L, Muehlenbachs A, Gary J, et al. Notes from the field: evidence of Zika virus infection in brain

FUNDING

This work was supported by FINEP and FAPEMIG grants to FR.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01016/full#supplementary-material>.

- and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses – Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (2016) 65:159–60. doi:10.15585/mmwr.mm6506e1
- Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med* (2016) 374:951–8. doi:10.1056/NEJMoa1600651
 - Ventura CV, Maia M, Bravo-Filho V, Gois AL, Belfort R Jr. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet* (2016) 387:228. doi:10.1016/S0140-6736(16)00006-4
 - Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimaraes KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* (2016) 534:267–71. doi:10.1038/nature18296
 - Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* (2016) 352:816–8. doi:10.1126/science.aaf6116
 - Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell* (2016) 19:120–6. doi:10.1016/j.stem.2016.04.017
 - Costa VV, Del Sarto JL, Rocha RF, Silva FR, Doria JG, Olmo IG, et al. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor blockade prevents neuronal death induced by Zika virus infection. *MBio* (2017) 8:e350–317. doi:10.1128/mBio.00350-17
 - Costa VV, Fagundes CT, Valadao DE, Avila TV, Cisalpino D, Rocha RF, et al. Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection induces severe disease in immunocompetent mice. *Med Microbiol Immunol* (2014) 203:231–50. doi:10.1007/s00430-014-0334-5
 - Doria JG, Silva FR, de Souza JM, Vieira LB, Carvalho TG, Reis HJ, et al. Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease. *Br J Pharmacol* (2013) 169:909–21. doi:10.1111/bph.12164
 - Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorescence. *J Neurochem* (1987) 49:50–7. doi:10.1111/j.1471-4159.1987.tb03393.x
 - Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* (2007) 35:W71–4. doi:10.1093/nar/gkm306
 - Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* (2013) 14:383–400. doi:10.1038/nrn3504
 - Mody I, MacDonald JF. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends Pharmacol Sci* (1995) 16:356–9. doi:10.1016/S0165-6147(00)89070-7
 - Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, et al. Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem* (2006) 281:21362–8. doi:10.1074/jbc.M600504200
 - Chen CJ, Ou YC, Chang CY, Pan HC, Liao SL, Chen SY, et al. Glutamate released by Japanese encephalitis virus-infected microglia involves TNF- α signaling and contributes to neuronal death. *Glia* (2012) 60:487–501. doi:10.1002/glia.22282
 - Szymocha R, Akaoka H, Dutuit M, Malcus C, Didier-Bazes M, Belin MF, et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1-infected T lymphocytes impair catabolism and uptake of glutamate by astrocytes via Tax-1 and tumor necrosis factor α . *J Virol* (2000) 74:6433–41. doi:10.1128/JVI.74.14.6433-6441.2000

32. Prow NA, Irani DN. The inflammatory cytokine, interleukin-1 beta, mediates loss of astroglial glutamate transport and drives excitotoxic motor neuron injury in the spinal cord during acute viral encephalomyelitis. *J Neurochem* (2008) 105:1276–86. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05230.x
33. Jara JH, Singh BB, Floden AM, Combs CK. Tumor necrosis factor alpha stimulates NMDA receptor activity in mouse cortical neurons resulting in ERK-dependent death. *J Neurochem* (2007) 100:1407–20. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04330.x
34. Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, et al. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci* (2003) 23:8692–700.
35. Thomas GM, Hagan RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* (2004) 5:173–83. doi:10.1038/nrn1346
36. Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* (2002) 5:405–14. doi:10.1038/nn835
37. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* (2010) 11:682–96. doi:10.1038/nrn2911
38. Parquet MC, Kumatori A, Hasebe F, Mathenge EG, Morita K. St. Louis encephalitis virus induced pathology in cultured cells. *Arch Virol* (2002) 147:1105–19. doi:10.1007/s00705-002-0806-6
39. Liao CL, Lin YL, Wang JJ, Huang YL, Yeh CT, Ma SH, et al. Effect of enforced expression of human bcl-2 on Japanese encephalitis virus-induced apoptosis in cultured cells. *J Virol* (1997) 71:5963–71.
40. Su HL, Liao CL, Lin YL. Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *J Virol* (2002) 76:4162–71. doi:10.1128/JVI.76.9.4162-4171.2002
41. Shrestha B, Gottlieb D, Diamond MS. Infection and injury of neurons by West Nile encephalitis virus. *J Virol* (2003) 77:13203–13. doi:10.1128/JVI.77.24.13203-13213.2003
42. Parquet MC, Kumatori A, Hasebe F, Morita K, Igarashi A. West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. *FEBS Lett* (2001) 500:17–24. doi:10.1016/S0014-5793(01)02573-X
43. Xu M, Lee EM, Wen Z, Cheng Y, Huang WK, Qian X, et al. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nat Med* (2016) 22:1101–7. doi:10.1038/nm.4184
44. Huang WC, Abraham R, Shim BS, Choe H, Page DT. Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. *Sci Rep* (2016) 6:34793. doi:10.1038/srep34793
45. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell* (2016) 18:587–90. doi:10.1016/j.stem.2016.02.016
46. Garcez PP, Nascimento JM, de Vasconcelos JM, Madeiro da Costa R, Delvecchio R, Trindade P, et al. Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. *Sci Rep* (2017) 7:40780. doi:10.1038/srep40780
47. Lum FM, Low DK, Fan Y, Tan JJ, Lee B, Chan JK, et al. Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. *Clin Infect Dis* (2017) 64:914–20. doi:10.1093/cid/ciw878
48. Ignatowski TA, Noble BK, Wright JR, Gorfien JL, Heffner RR, Spengler RN. Neuronal-associated tumor necrosis factor (TNF alpha): its role in noradrenergic functioning and modification of its expression following antidepressant drug administration. *J Neuroimmunol* (1997) 79:84–90. doi:10.1016/S0165-5728(97)00107-0
49. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, et al. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* (1994) 25:1481–8. doi:10.1161/01.STR.25.7.1481
50. Kumar M, Verma S, Nerurkar VR. Pro-inflammatory cytokines derived from West Nile virus (WNV)-infected SK-N-SH cells mediate neuroinflammatory markers and neuronal death. *J Neuroinflammation* (2010) 7:73. doi:10.1186/1742-2094-7-73
51. Olmos G, Llado J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm* (2014) 2014:861231. doi:10.1155/2014/861231
52. Pickering M, Cumiskey D, O'Connor JJ. Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol* (2005) 90:663–70. doi:10.1113/expphysiol.2005.030734
53. Randall RD, Thayer SA. Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* (1992) 12:1882–95.
54. Weaver-Mikaere L, Gunn AJ, Mitchell MD, Bennet L, Fraser M. LPS and TNF alpha modulate AMPA/NMDA receptor subunit expression and induce PGE2 and glutamate release in preterm fetal ovine mixed glial cultures. *J Neuroinflammation* (2013) 10:153. doi:10.1186/1742-2094-10-153
55. Dong Y, Kalueff AV, Song C. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium overload and endoplasmic reticulum stress are involved in interleukin-1beta-induced neuronal apoptosis in rat hippocampus. *J Neuroimmunol* (2017) 307:7–13. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.03.005
56. Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyakkers A, Liu L, Lai TW, et al. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* (2007) 27:2846–57. doi:10.1523/JNEUROSCI.0116-07.2007
57. Vanhoutte P, Bading H. Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Curr Opin Neurobiol* (2003) 13:366–71. doi:10.1016/S0959-4388(03)00073-4
58. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* (1994) 12:529–40. doi:10.1016/0896-6273(94)90210-0
59. Tovar KR, Westbrook GL. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* (1999) 19:4180–8.
60. Martel MA, Wyllie DJ, Hardingham GE. In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience* (2009) 158:334–43. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.080
61. Groc L, Heine M, Cousins SL, Stephenson FA, Lounis B, Cognet L, et al. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103:18769–74. doi:10.1073/pnas.0605238103
62. Steigerwald F, Schulz TW, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH, Kohr G. C-terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors. *J Neurosci* (2000) 20:4573–81.
63. Petralia RS. Distribution of extrasynaptic NMDA receptors on neurons. *ScientificWorldJournal* (2012) 2012:267120. doi:10.1100/2012/267120
64. Thomas CG, Miller AJ, Westbrook GL. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* (2006) 95:1727–34. doi:10.1152/jn.00771.2005
65. Harris AZ, Pettit DL. Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. *J Physiol* (2007) 584:509–19. doi:10.1113/jphysiol.2007.137679
66. Bading H, Ginty DD, Greenberg ME. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* (1993) 260:181–6. doi:10.1126/science.8097060
67. Zhang SJ, Steijaert MN, Lau D, Schutz G, Delucinge-Vivier C, Descombes P, et al. Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron* (2007) 53:549–62. doi:10.1016/j.neuron.2007.01.025
68. Zhang SJ, Zou M, Lu L, Lau D, Ditzel DA, Delucinge-Vivier C, et al. Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS Genet* (2009) 5:e1000604. doi:10.1371/journal.pgen.1000604
69. Lau D, Bading H. Synaptic activity-mediated suppression of p53 and induction of nuclear calcium-regulated neuroprotective genes promote survival through inhibition of mitochondrial permeability transition. *J Neurosci* (2009) 29:4420–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.0802-09.2009
70. Leveille F, Papadia S, Fricker M, Bell KF, Soriano FX, Martel MA, et al. Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. *J Neurosci* (2010) 30:2623–35. doi:10.1523/JNEUROSCI.5115-09.2010
71. Papadia S, Stevenson P, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE. Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci* (2005) 25:4279–87. doi:10.1523/JNEUROSCI.5019-04.2005

72. Chandler LJ, Sutton G, Dorairaj NR, Norwood D. N-methyl D-aspartate receptor-mediated bidirectional control of extracellular signal-regulated kinase activity in cortical neuronal cultures. *J Biol Chem* (2001) 276:2627–36. doi:10.1074/jbc.M003390200
73. Kim MJ, Dunah AW, Wang YT, Sheng M. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron* (2005) 46:745–60. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.031
74. Leveille F, El Gaamouch F, Gouix E, Lecocq M, Lobner D, Nicole O, et al. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J* (2008) 22:4258–71. doi:10.1096/fj.08-107268
75. Ivanov A, Pellegrino C, Rama S, Dumalska I, Salyha Y, Ben-Ari Y, et al. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* (2006) 572:789–98. doi:10.1113/jphysiol.2006.105510
76. Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98:2808–13. doi:10.1073/pnas.051634198

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Olmo, Carvalho, Costa, Alves-Silva, Ferrari, Izidoro-Toledo, da Silva, Teixeira, Souza, Marques, Teixeira, Vieira and Ribeiro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.