UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Glaucia Maria de Almeida

Estudo da infecção do sistema nervoso central pelo vírus Oropouche em
um modelo de fatias de cérebro humano adulto

Ribeirão Preto / SP

2020

Glaucia Maria de Almeida

**Estudo da infecção do sistema nervoso central pelo vírus Oropouche em
um modelo de fatias de cérebro humano adulto**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Adriano Silva Sebollela

Coorientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por meio de qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Glaucia Maria

Estudo da infecção do sistema nervoso central pelo vírus Oropouche em um modelo de fatias de cérebro humano adulto. Ribeirão Preto, 2020.

70p.: il., 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Sebollela, Adriano

Coorientador: Arruda, Eurico

Palavras-chave: arbovírus; cérebro humano; cultura organotípica; infecção viral; neurotropismo viral; neuropatogênese.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Almeida, Glaucia Maria. Estudo da infecção do sistema nervoso central pelo vírus Oropouche em um modelo de fatias de cérebro humano adulto.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

A FAPESP, pela bolsa de mestrado a mim concedida (#18/06614-4) e pelo suporte financeiro ao laboratório (#14/25681-3). A CAPES, CNPq e FAEPA também pelo apoio financeiro indireto a esse projeto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Sebollela, por me auxiliar em mais uma etapa na construção da minha carreira científica. Foi um prazer enorme poder ter sido sua aluna na graduação e na pós-graduação. Cresci muito com você em todos esses anos. Levarei seus ensinamentos para toda minha carreira e toda minha vida. Admiro demais você. Obrigada pela oportunidade!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Eurico Arruda, o responsável por me fazer amar os vírus. Obrigada pela oportunidade de aprender ainda mais sobre eles com você, tanto na graduação quanto na pós-graduação. Agora você tem mais uma cria do “time Oropouche”.

À minha base de tudo, minha família: minha mãe Marli, meu pai Luiz Donizeti; meus irmãos Gabriela e Gabriel e aos presentes que eles me deram, meus sobrinhos Luiza e Benício. Vocês são minha força. Eu não teria conseguido nada disso sem vocês. Obrigada por tudo, eu amo vocês demais.

À minha avó Maria de Lourdes (*in memoriam*). Desde pequena acompanhava ela nas consultas no HC e sempre dizia: “Vovó, eu vou estudar aqui quando crescer. Vou ajudar as pessoas igual os médicos ajudam você”. Não nasci pra ser médica vovó, mas gosto de fazer “um trem” que chamam de ciência. Essa etapa da minha vida é o comecinho da minha carreira pra ser uma cientista. Lembro de você todo dia que entro na universidade. Saudade eterna, isso aqui é pra você também.

Aos meus amigos que sempre me acompanharam e deram apoio, fazendo com que a vida ficasse mais leve. Eu não sei o que seria de mim sem vocês. Um agradecimento especial a uma pessoa que me apoiou demais em todos os momentos e compartilhou tanta coisa comigo, independentemente de qualquer coisa, e eu não poderia deixar de citar aqui: Dani Tucci, obrigada por tanto!

Aos meus amigos do laboratório: Mariane, Nathalia, Raquel, Andressa e Giulia. Obrigada pelos bolos, cafés, discussões, conversas e risadas de todos esses anos.

Um agradecimento especial ao time dos organotípicos Niele, Giovanna e Artur, que dividiram tanta coisa comigo ao longo desses anos.

Aos meus amigos do Laboratório de Patogênese Viral, principalmente ao Ricardo - o grande cientista trabalhador brasileiro - que me apoiou desde o início desse projeto; e ao Juliano e a Marjorie, os Oropouchólogos que me fizeram apaixonar ainda mais por esse vírus. Eu cresci demais com as discussões que tivemos.

Aos amigos do prédio central, aos cafés que terminavam em novas ideias para experimentos e colaborações. Vocês fazem parte do meu crescimento científico e pessoal também.

À Silvana e a Pitty, pelas conversas, conselhos e suporte técnico de todos esses anos. Obrigada demais, vou levar vocês com carinho no meu coração.

Um agradecimento especial à Bete pelos treinamentos e pelas discussões sobre microscopia de fluorescência. Apreendi muito com você.

Ao Laboratório multiusuário de microscopia Confocal e Microscopia Eletrônica da FMRP/USP por todo suporte ao trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos e do Centro de Pesquisa em Virologia por estarem sempre disponíveis e serem tão atenciosos.

RESUMO

Almeida, Glaucia Maria. **Estudo da infecção do sistema nervoso central pelo vírus Oropouche em um modelo de fatias de cérebro humano adulto**. Ribeirão Preto, 2020.

O vírus Oropouche (OROV), da família *Peribunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, é um agente causador da arbovirose chamada “febre de Oropouche”. Esse vírus possui uma significativa capacidade de disseminação e nos últimos anos tem sido encontrado em regiões que não são consideradas endêmicas, principalmente em países da América do Sul, inclusive o Brasil. Apesar de algumas evidências clínicas observadas em humanos associarem a infecção por OROV à alterações no sistema nervoso central, como meningite, poucos estudos envolvendo a neuropatogênese de OROV tem sido estudada, e todo conhecimento adquirido tem sido obtido de modelos murinos neonatos. Essa dificuldade de se estudar a neuropatogênese de OROV no sistema nervoso central humano está muito relacionado a falta de modelos descritos e que retratam a complexidade do cérebro humano. Portanto, nesse estudo, nós avaliamos a neuroinfecção pelo OROV utilizando um modelo de fatia de cérebro humano adulto. Mostramos pela primeira vez que OROV é capaz de infectar células neurais humanas e causar danos no tecido em 48 h pós infecção, como perda de viabilidade celular e liberação TNF- α , uma citocina pró-inflamatória. Observamos, por imunofluorescência, que micróglia é a célula mais susceptível a infecção por OROV, mas que este mantém a capacidade de infectar neurônios. Esse é o primeiro estudo a reportar a neuroinfecção de OROV em um modelo de cérebro humano e pode abrir caminhos para o estudo de mecanismos neuropatogênicos associado a infecção desse patógeno emergente.

Palavras-chave: arbovírus; cérebro humano; cultura organotípica; infecção viral; neurotropismo viral; neuropatogênese

ABSTRACT

Almeida, Glaucia Maria. **Study of central nervous system infection by the Oropouche vírus in adult human brain slice cultures**. Ribeirão Preto, 2020.

The Oropouche virus (OROV), of the family *Peribunyaviridae*, genus *Orthobunyavirus*, is a causative agent of arbovirus called “Oropouche fever”. This virus has the significant spreading capacity, and in recent years has been found in nonendemic region, especially in South American countries, including Brazil. Although some clinical evidences in alterations in central nervous system, as meningitis, has been associated with OROV infection, few studies involving OROV neuropathogenesis have been studied, and all knowledge obtained were showed from neonatal murine models. This difficulty in studying OROV neuropathogenesis in the human central nervous system is related to the lack of models that maintain the complexity of human brain. Therefore, in this study, we evaluated the OROV neuroinfection using adult human brain slices cultures. We showed for the first time that OROV infects human neural cells and caused tissue damage within 48 h post infection, such as loss of cell viability and TNF- α release, a proinflammatory cytokine. We showed, by immunofluorescence, microglia cells were the cell most susceptible to OROV infection, but that it retains the ability to infect neurons. This is the first study to report OROV infection in adult human brain model and should become useful in neuropathogenesis studies related to this emerging pathogen.

Keywords: arbovirus; human brain; organotypic culture; viral infection; viral neutropism; neuropathogenesis

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ActD: actinomicina D

BDNF: *Brain-derived Neurotrophic Factor*

BSA: albumina do soro bovino

CEUA: Comitê de Ética de Uso de Animais

CS: Citrato sintase

CCHFV: *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DIV: dias *in vitro*

DO: densidade óptica

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DPI: dias pós-infecção

ESCRT: *endosomal sorting complexes required for transport*

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*

HBSS: *Hank's balanced salt solution*

HCRP: Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

HPI: horas pós-infecção

Iba1: *ionized calcium-binding adapter molecule 1*

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

IFN- γ : Interferon gamma

IL-10: Interleucina -10

M.O.I: *multiplicity of infection*

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil Brometo de Tetrazolina

NeuN: proteína marcadora núcleo neuronal.

OROV: vírus Oropouche

PBS: *phosphate-buffered saline*

PEG: Polietilenoglicol

Rpm: rotação por minuto

SEM – Erro padrão

SFB: soro fetal bovino

SNC: sistema nervoso central

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TCDI50: *50% tissue culture infective dose*

USP: Universidade de Ribeirão Preto

Sumário

1) INTRODUÇÃO	13
2) OBJETIVOS.....	23
2.1 – Objetivo geral	23
2.2 – Objetivos específicos.....	23
3) METODOLOGIA	25
3.1 – Vírus	25
3.2 - Preparação e cultivo das fatias corticais humanas adultas	25
3.3 – Infecção viral	27
3.4 – Imunofluorescência	27
3.5 – Precipitação viral	28
3.6 –Microscopia eletrônica.....	28
3.7 – Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	29
3.8 – Ensaio da atividade da enzima citrato sintase.....	29
3.9 – ELISA para dosagem de citocinas	30
3.10 – Diferenciação celular da linhagem SH-SY5Y	30
3.11 – Infecção por OROV <i>in vivo</i> em camundongos adultos	31
3.12 – Análise estatística.....	32
4) RESULTADOS	34
4.1 – Susceptibilidade e permissividade das fatias cerebrais humanas adultas à infecção por OROV	34
4.2 –Neuropatogênese nas fatias cerebrais humanas infectadas por OROV	38
4.3 – Identificação das células neurais humanas susceptíveis à infecção por OROV.....	40
4.4 – Neuroinfecção <i>in vivo</i> por OROV em modelo animal adulto de infecção ...	44
5) DISCUSSÃO	48
6) CONCLUSÃO	56
 REFERÊNCIAS.....	 58
ANEXO I – Artigo publicado em maio de 2018 no Journal of Neuroscience Methods.....	69
ANEXO II – Artigo publicado em novembro de 2019 no Journal of Visualized Experiments.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da partícula de OROV.....	13
Figura 2 – Viabilidade e funcionalidade celular nas fatias cerebrais humanas adultas cultivadas em <i>free-floating</i>	17
Figura 3 - Coleta e processamento de amostra de tecido para cultura de fatias.....	22
Figura 4 - Infecção por OROV nas fatias cerebrais humanas adultas.....	28
Figura 5 - Produção de partículas virais em fatias cerebrais humanas adultas.....	30
Figura 6 – Patogênese do OROV em fatias cerebrais humanas	32
Figura 7 – Susceptibilidade das principais células do SNC à infecção por OROV em fatias de cérebro humano adulto.....	34
Figura 8 – Infecção e produção de progênie viral por OROV em linhagem celular de neuroblastoma humano.....	36
Figura 9. Neuroinfecção por OROV in vivo em camundongos C57BL/6 adultos	38

INTRODUÇÃO

1) INTRODUÇÃO

O vírus Oropouche (OROV) é um arbovírus que pertence à família *Peribunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus* (ICTV, EC 48, Budapest, Hungary, agosto 2016) tendo sido isolado pela primeira vez em 1955 do sangue de um paciente com doença febril, em Trinidad e Tobago (Anderson et al, 1961). No Brasil, OROV foi isolado pela primeira vez em 1960 do sangue de um bicho-preguiça no estado do Pará, em uma região próxima à área onde estava sendo construída a rodovia Belém-Brasília (Pinheiro et al, 1962). OROV possui um ciclo silvestre, que envolve diferentes hospedeiros vertebrados e alguns artrópodes, e o ciclo urbano, que possui o ser humano como principal hospedeiro, sendo a mosca hematófaga *Culicoides paraenses* (popularmente conhecida como maruim ou pólvora) seu principal vetor (Pinheiro et al. 1981; Nunes et al. 2007).

A doença no ser humano decorrente da infecção por OROV é chamada de “febre de Oropouche”, e possui como principais sintomas: febre, mialgia, cefaleia, fotofobia e intensa dor retroorbitária. Apesar desses sintomas debilitarem o paciente de forma aguda e de impedirem o exercício normal de suas atividades, ainda não há registro de morte direta decorrente dessa infecção. Entretanto, a infecção por OROV apresenta um importante impacto em saúde pública em países das Américas do Sul e Central, como Brasil, Peru e Equador, que recentemente relataram novos casos de infecção por OROV, inclusive casos fora de regiões consideradas endêmicas (Silva-Caso et al. 2019; Wise et al. 2019).

No Brasil, OROV era a segunda arbovirose mais frequente até o aparecimento do vírus Zika (ZIKV), sendo que as regiões mais afetadas são os estados do Pará, Amazonas, Amapá, Acre, Rondônia, Tocantins e Maranhão (Travassos Da Rosa et al., 2017; Sakkas et al, 2018). Em 2014, registrou-se o primeiro relato de infecção

humana fora desses Estados, pela detecção por RT-PCR e imunofluorescência em leucócitos do sangue periférico de uma paciente que adquiriu o vírus em viagem à Porto Seguro, na Bahia (de Souza Luna et al. 2017). OROV também chama a atenção pelo seu potencial de disseminação, já que uma cepa viral que anteriormente era encontrada apenas no Panamá foi isolada de um primata morto no Parque Nacional Grande Sertão Veredas, em Minas Gerais, e também pelo aumento de surtos registrados nos últimos anos (Teixeira Nunes et al., 2005; Mourão et al., 2009, 2015; Gibrail et al., 2016).

Apesar do seu importante impacto em saúde pública (26 casos identificados no Brasil somente em outubro de 2019, segundo boletim publicado pelo Ministério da Saúde) e do conhecido potencial de disseminação do vírus, pouco se sabe sobre a biologia de OROV. A maior parte do conhecimento obtido sobre a estrutura e replicação viral, por exemplo, advém de experimentos que utilizaram outros *Orthobunyavirus*, como Bunyawera (BUNV) e Lacrosse (LACV) como modelos.

A partícula de OROV (Fig. 1) possui diâmetro entre 80-120 nm, a qual é envolta por uma membrana na qual se ancoram glicoproteínas importantes para sua ligação a um receptor na membrana da célula hospedeira. O genoma viral é composto por três segmentos de RNA de polaridade negativa, chamados de L (*large*), M (*medium*) e S (*small*) (Schamaljhon et al, 2013; Elliott, 2014).

Figura 2 – Representação esquemática da partícula de OROV. OROV possui três segmentos de RNA de polaridade negativa (L, M e S), que juntos com a proteína estrutural N formam o nucleocapsídeo viral. A proteína L está relacionada a replicação do vírus, e as proteínas Gc e Gn, presentes no envelope lipídico, estão relacionadas ao ancoramento na membrana da célula hospedeira. Figura adaptada de Elliot et al 2014.

O segmento L codifica uma proteína chamada L, que possui atividade de RNA-polimerase-RNA-dependente (RpRd), que é parte integrante do nucleocapsídeo, e que executa a transcrição e a replicação dos segmentos do RNA viral. O segmento M codifica uma poliproteína, a qual sofre clivagem e origina as proteínas estruturais Gn, Gc e a proteína não estrutural NSm. O segmento S codifica a proteína estrutural N e, em uma ORF (*Open Reading frame*) alternativa codifica a proteína não estrutural NSs (Walter and Barr 2011; Elliott et al. 2013; Tilston-Lunel et al. 2015)

O ciclo de replicação do OROV se inicia com a ligação do vírus a um receptor ainda desconhecido na membrana celular de uma célula susceptível à infecção, seguido da endocitose mediada por clatrina, cuja acidificação do endossomo resulta no processo de fusão do envelope viral à membrana do endossomo, o que leva ao

desnudamento dos ribonucleocapsídeos no citoplasma (Santos et al., 2008). Essa exposição no citoplasma resultará na transcrição de segmentos de RNA envolvidos na replicação do genoma e, também, na tradução das proteínas virais. Detalhes da montagem do OROV foram recentemente publicados, e revelaram que esta ocorre no complexo de Golgi, e é dependente do recrutamento da maquinaria de ESCRT (Barbosa et al. 2018).

Assim como mais detalhes da replicação de OROV ainda não são totalmente esclarecidos, sua patogênese também é pouco conhecida, e por isso é alvo de estudos de alguns grupos no mundo. A infecção humana por OROV é sistêmica, e aproximadamente 5% dos pacientes possuem acometimento do sistema nervoso central (SNC), com meningite ou meningoencefalite (Pinheiro et al. 1982; Figueiredo 2007; da Costa et al. 2017a; Sakkas et al. 2018). OROV foi detectado por RT-PCR no líquido cefalorraquidiano de três pacientes em Manaus, dois dos quais com doenças que podem debilitar a resposta imune do paciente, como neurocisticercose e HIV/Aids (Bastos et al. 2012). Mais recentemente, houve o relato de uma meningite asséptica em um paciente imunocompetente (Vernal and Martini 2019), o que mais uma vez evidencia o tropismo do vírus Oropouche para o SNC. Como já mencionado, há relatos de infecção de OROV em leucócitos do sangue periférico, sendo que esta pode ser uma possível rota que OROV poderia usar para atingir o SNC, a chamada estratégia de cavalo de Tróia (de Souza Luna et al. 2017).

Visando entender os processos patogênicos decorrentes da infecção por OROV, alguns modelos *in vitro* e *in vivo* já foram descritos. Em um modelo de células de linhagem humana (HeLa), foi demonstrado que OROV desencadeia apoptose pela via mitocondrial (Acrani et al., 2010). Já em modelos murinos, como camundongos e hamster, foi demonstrado que cerca de metade dos animais inoculados desenvolvem

infecção sistêmica sintomática, e que OROV possui uma rota neural que resulta na infecção de neurônios, provocando intensa reação astrocitária e microglial (Rodrigues et al. 2011a; Santos et al. 2012, 2014a). Nesses mesmos estudos, observou-se também que ocorre apoptose neuronal, tanto em neurônios infectados como em neurônios não infectados, possivelmente em decorrência da ação parácrina de algum mediador liberado pelas células infectadas (Santos et al., 2012; Santos, et al., 2014). Também em modelos murinos, foi mostrado um aumento na produção de IFN-1 mediado pela ativação de proteína MAVS (*Mitochondrial antiviral-signaling protein*) e dos fatores de transcrição IRF 3 e 7 (*Interferon regulatory factor*), sendo que essas respostas controlam a replicação viral e aumentam a sobrevivência dos animais após a infecção (Proenca-Modena et al. 2015). A infecção de modelos murinos por OROV resulta também na ativação de *interferon-response fator 5 (IRF5)*, e essa ativação tem sido descrita como uma importante via de resposta antiviral para inibir a neuroinvasão desse vírus (Proenca-modena et al. 2016).

Como pode-se concluir pelos achados descritos, os únicos modelos já desenvolvidos e utilizados para estudar a infecção e a patogênese de OROV são derivados de murinos. Considerando as importantes diferenças estruturais e funcionais entre camundongos e os seres humanos, com impacto em estudos que buscam entender a interação patógeno-hospedeiro (Hellmann et al. 2017; Mestas and Hughes 2004a), torna-se estratégico o desenvolvimento de modelos para estudo de OROV com maior poder translacional. Nos últimos anos, vários grupos têm se dedicado a superar as dificuldades de estabelecer modelos que representem a complexidade do ser humano. Nessa linha, um dos modelos que tem ganhado cada vez mais aplicações em estudos de patologias do sistema nervoso central, e que abre portas para estudos translacionais, são fatias de cérebro humano, chamadas de

culturas organotípicas, histoculturas neurais, ou simplesmente culturas de fatias de cérebro (Qi et al., 2019).

Cultura de fatias de tecido neural têm sido preparadas desde 1947, a partir de estruturas como córtex, cerebelo ou hipocampo de roedores e/ou humanos (Hogue, 1947; Humpel, 2015). Um protocolo clássico de cultivo de tecido neural de rato sobre lamelas de vidro foi descrito por (Gähwiler 1981), o qual foi modificado e melhorado por Stoppini e colaboradores em 1991, com a introdução do cultivo sobre uma membrana semiporosa (ou insertos) (Stopinni et al., 1991). Esse modelo de cultivo é até hoje amplamente usado em estudos de estrutura e função neurais (Mewes et al., 2012; Kim et al., 2013; Humpel, 2015; Healy et al., 2016). A principal vantagem desse modelo é a preservação da arquitetura e das conexões neurais presentes *in vivo* (Gähwiler et al., 1997; Pham e Chan, 2014), mantendo, inclusive, sua conectividade sináptica original, tornando o modelo mais próximo do fisiológico quando comparado a culturas de células dissociadas (Jeong et al., 2015; Noort, 2006). Apesar dessas vantagens, esse modelo - derivado de roedores - apresenta limitações quando usado como modelo de estudo de mecanismos de patologias humanas, devido às diferenças na expressão gênica e em outros eventos celulares que limitam sua utilização como modelo em pesquisa translacional (Miller et al., 2010; Chaichana et al., 2009). Portanto, culturas obtidas de tecidos neurais humanos se tornam uma opção interessante para estudos translacionais em diversas áreas da neurociência.

Uma das aplicações interessantes do modelo de culturas de fatias são os estudos de infecções que envolvem o sistema nervoso central. Estudos relativos a neuroinfecções virais tem sido descritos, os quais fazem uso tanto de tecidos obtidos a partir de cérebros post mortem (Martinez et al., 2011; Retallack et al., 2016) como de tecidos obtidos de ressecções cirúrgicas (Figueiredo et al., 2019).

A utilização de tecido cerebral humano obtido por ressecções cirúrgicas para preparo de culturas de fatias tem ganhado força nos últimos anos. Na maior parte dos estudos, o tecido cerebral é obtido da retirada de tumores ou de foco epilético em pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) resistente ao tratamento farmacológico (Brewer et al., 2001; Sebollela et al., 2012; Verhoog et al., 2013; Eugène et al., 2014; Mendes et al., 2018). Nesse procedimento, pacientes com ELT refratários a tratamento farmacológico são submetidos a remoção cirúrgica do foco epilético que, nesses casos, se encontra no hipocampo. Para que esse foco seja retirado, há a necessidade de remover uma pequena porção de tecido cortical temporal anterior, para garantir acesso ao hipocampo afetado, e esse tecido cortical, que seria descartado, pode ser utilizado em pesquisas.

Nosso grupo de pesquisa já possui experiências no cultivo de fatias de cérebro humano, e por meio de uma colaboração com o Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, realizamos a coleta do material cortical obtido dessas remoções cirúrgicas e o processamento deste para cultivo das fatias cerebrais. Já demonstramos que, com nosso protocolo, as fatias se mantêm viáveis e funcionais por até 5 dias *in vitro* (5 DIV) (Fig. 2) (Mendes et al. 2018; Fernandes et al. 2019).

Figura 2 – Viabilidade e funcionalidade celular nas fatias cerebrais humanas adultas cultivadas em *free-floating*. (A) Imunohistoquímica para avaliação da morfologia dos principais fenótipos neurais presentes na fatia em 4 dias *in vitro* (DIV). (A') neurônios presentes nas diferentes camadas corticais (representadas por números romanos); (A'') micróglias e (A''') astrócitos. (B) Viabilidade celular preservada nas fatias em 4DIV com base no teste de redução de MTT. (B') representação de uma fatia controle, sem MTT e (B'') representação de uma fatia após incubação com MTT. (C) Membrana representativa da detecção por Western Blott de proteína pERK - que possui papel na funcionalidade neuronal - após estímulo despolarizante induzido por KCl em fatias cultivadas por 5DIV. (D) Quantificação da porcentagem de aumento de pERK em fatias despolarizadas em relação ao controle não despolarizado, indicando aumento na razão pERK/tERKt e manutenção de funcionalidade neuronal em 5DIV. Barra de escala 100 µm. Dados retirados dos artigos publicados por nosso grupo (Mendes et al 2018; Fernandes et al, 2019).

Portanto, por termos um modelo de cérebro humano adulto padronizado em nosso laboratório e sabendo-se que OROV é um importante vírus em saúde pública e que se torna necessário novos estudos que demonstrem os mecanismos associados neuropatogênese desse emergente arbovirus (Henry, R.; Murphy 2018; Romero-Alvarez and Escobar 2018; Sakkas et al. 2018), o objetivo do presente trabalho foi avaliar a susceptibilidade de células neurais humanas à infecção pelo OROV utilizando nosso modelo de fatias de cérebro humano adulto. Também aprofundamos os estudos para caracterizar fenótipos celulares neurais humanos infectados e possíveis alterações celulares e teciduais que possam estar associadas à patogênese desse vírus no SNC humano. Com esse trabalho buscamos contribuir para o entendimento da neuroinfecção humana desse emergentes arbovírus, assim como abrir perspectivas para que esse modelo possa ser utilizado para se obter conhecimentos acerca da patogênese humana de vírus neurotrópicos.

OBJETIVOS

2) OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Estudar a neuroinfecção pelo OROV em um modelo de fatias de cérebro humano adulto, contribuindo para o entendimento da neuropatogênese desse importante arbovírus no SNC humano.

2.2 – Objetivos específicos

- Determinar a susceptibilidade e permissividade de células neurais humanas adultas à infecção por OROV, ou seja, a capacidade de células de serem infectadas e de serem permissivas a replicação viral, respectivamente;
- Avaliar a viabilidade celular e o padrão de liberação de citocinas pelas células presentes nas fatias cérebro humano adulto frente a infecção por OROV;
- Avaliar fenótipos neurais humanos infectados por OROV;
- Avaliar a capacidade de neuroinfecção do OROV em um modelo *in vivo* de camundongos C57BL/6 adultos.

METODOLOGIA

3) METODOLOGIA

3.1 – Vírus

OROV (cepa BeAN 19991) foi cedido pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Moares Figueiredo (FMRP, USP), originalmente obtido do Instituto Evandro Chagas (Belém, Pará). O estoque foi propagado em monocamada de células Vero cultivadas em DMEM suplementado com 2% SFB, L-glutamina e solução de penicilina-estreptomicina. Os títulos virais foram obtidos por TCID₅₀. O sobrenadante das células Vero não infectadas com OROV (mock) foi usado como controle negativo em todos os experimentos.

3.2 - Preparação e cultivo das fatias corticais humanas adultas

O tecido cortical foi obtido de pacientes submetidos à hipocampectomia para o tratamento da epilepsia do lobo temporal resistente a fármacos (n= 17). Um fragmento de córtex foi coletado na sala cirúrgica imediatamente após a ressecção (1x1x1 cm) e transportado para o laboratório em meio de transporte (50% v/v HBSS suplementado com 10 mM de Hepes, 3 mg/mL de glicose e 50% v/v meio Neurobasal A gelado e oxigenado com 95% de O₂ e 5% de CO₂ (Fig. 3A-C). O excesso de pia máter foi retirado do tecido (Figura 3D), o tecido foi colocado no suporte (Fig. 3E) e fatiado a 200 µm em um vibrátomo automático VT1000s Leica (Fig. 3F). Após o corte, as fatias foram cultivadas em Neurobasal A (Gibco) suplementado com 1% de Glutamax (Gibco), 1% de Penicilina /Estreptomicina (Gibco), 2% de B27 (Gibco) e 0,25 µg / mL de Fungizona (Sigma) (Fig. 3G). No final do Dia 0, 200 µL do meio foram substituídos por meio fresco suplementado com 50 ng / mL de BDNF (Sigma). As fatias foram mantidas a 36° C e 5% de CO₂. Os detalhes do protocolo estão descritos em Mendes et al. (2018) e Fernandes et al. (2019). Todo procedimento foi aprovado pela Comitê

de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Projeto #HCRP # 17578/15).

Figura 3 - Coleta e processamento de amostra de tecido para cultura de fatias. (A) Campo cirúrgico aberto em que se retira córtex cerebral do lobo temporal. (B) Amostra de córtex do lobo temporal disponibilizada pelo neurocirurgião. (C) Amostra transportada em meio de transporte específico, gelado e oxigenado. (D) Retirada de vasos sanguíneos superficiais e resto de meninges. (E) Posicionamento da amostra em suporte do vibrátomo. (F) Fatiamento da amostra de 200 μ m em vibrátomo. (G) Fatias em placa de cultura com meio próprio.

3.3 – Infecção viral

Após 1 ou 2 dias *in vitro* (1DIV ou 2DIV), o meio de cultura foi removido, e as fatias foram expostas a 3×10^6 TCID₅₀/μL de OROV em um volume total de 300 μL de estoque viral ou volume equivalente de mock (sobrenadante de células Vero não infectadas). As fatias foram mantidas a 37°C/ 5%CO₂ por 2 h. Em seguida, todo o meio foi retirado, e as fatias foram lavadas 3x com PBS e 1x com meio Neurobasal A para retirar partículas virais remanescentes (este meio foi armazenado a -80°C para ser utilizado como controle em análises posteriores de produção de partícula viral). As fatias foram mantidas em meio Neurobasal A suplementado com 1% de Glutamax (Gibco), 1% de Penicilina /Estreptomicina (Gibco), 2% de B27 (Gibco) e 0,25 μg / mL de Fungizona (Sigma) a 37°C /5% CO₂ por 24, 48 ou 72 horas após a infecção (HPI). Alíquotas do meio de cultura foram coletadas em diferentes tempos para determinação de produção de partícula viral.

3.4 – Imunofluorescência

Após 24 ou 48 hpi, as fatias foram fixadas por 24 h em paraformaldeído (4%). Em seguida, foram incubadas por 2 h com 0,3% Triton-x 100 em PBS, lavadas com solução de lavagem (0,2% Triton-x100, 1% BSA em PBS) e incubadas com glicina 0,1 M por 1 h. Em seguida, lavou-se as fatias e incubou-as com 2% BSA por 2h. Os anticorpos primários anti-soro anti-OROV de camundongo (gentilmente doado pelo Dr. Luis Tadeu Moraes Figueiredo; 1: 300) (Rodrigues et al. 2011a) ; anti-NeuN (Abcam; ab177487; diluição 1: 1000), anti-GFAP (Merck, ab5804; diluição 1: 1000) ou anti-Iba1 (Abcam, ab178846; diluição 1: 2000) foram diluídos em 0,2% Triton-x 100 e 2% BSA, e incubados por 24 h a 4°C. As fatias foram lavadas três vezes com solução de lavagem, e incubadas com anticorpos secundários Alexa Fluor 488 (Life technologies; A-11001), Alexa Fluor 568 (Life technologies; A-11011) e DAPI diluídos em 2% BSA por 1 h. Em seguida, as fatias foram lavadas com solução de lavagem

novamente, incubadas por 5 min com etanol a 70% e, em seguida, com 0,1% de Sudan Black em etanol 70% por 5 min. Em seguida, lavou-se duas vezes com etanol 70% e montadas nas lâminas com Fluoromont (Thermo Fisher). As fatias foram analisadas em um microscópio confocal de varredura a laser Zeiss (LSM) 780 (Zeiss, Jena, Alemanha) ou um microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). O processamento e análises das imagens foram realizados utilizando o software Fiji (Schindelin et al. 2012).

3.5 – Precipitação viral

As partículas virais no sobrenadante das fatias infectadas foram precipitados pelo protocolo de PEG, o qual já foi utilizado para vírus Bunyawera (BUNV) (Hover et al. 2018), com algumas modificações. Os sobrenadantes foram incubados com solução 20% de polietilenoglicol 6000 (PEG, Sigma) diluído em 2,5 M de NaCl (PEG/NaCl) na proporção de 1:4 (PEG/NaCl:sobrenadante), que foi suavemente homogeneizado e mantida em gelo por 1 h. Em seguida, a solução foi centrifugada a 10800g por 30 min a 4°C, e o pellet ressuspendido em 8µL de PBS, ao qual foi adicionado 2µL de PEG. A suspensão foi homogeneizada e mantida em gelo por 20 min. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 3300g por 30 min a 4°C e o novo pellet ressuspendido em 50µL de PBS, o qual submetido à centrifugação a 11600g por 10 min a 4°C. A preparação foi imediatamente diluída a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} em meio DMEM 2% que foram utilizadas para titulação de OROV em monocamada de células Vero. A titulação foi normalizada pela massa de cada fatia (Santos et al. 2014).

3.6 –Microscopia eletrônica

O tecido foi fixado com glutaraldeído 3% em tampão fosfato 0,1M 24h a 4°C. Em seguida, lavou-se por 3x em tampão fosfato. Adicionou-se 2% de tetróxido de

ósio, seguido de incubação por 2h a 4°C. Após lavagem (3x) com tampão fosfato 0,1M, iniciou-se os passos de desidratação em acetona: 10' a 30%, 10' a 50%, 10' a 70%, 10' a 90%, e 3 passos de 20' a 100%. Após a desidratação, o tecido foi deixado em resina Araldite na proporção 1:1 com acetona por 24h. A inclusão foi feita em resina araldite 6005 por 2h a 37°C. Para seleção da área de interesse, o tecido foi colocado em lâmina de vidro e corado com azul de toluidina. O excesso da resina foi removido, e o tecido foi cortado em navalha de diamante. O contraste foi realizado com 0,5% acetato de uranila (45') e citrato de chumbo (5'). Após secagem da grade, o material foi analisado no microscópio eletrônico JEOL JEM-100CX II (JEOL, USA, MA, EUA) no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

3.7 – Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular da cultura da fatia foi avaliada usando o ensaio de MTT, como descrito previamente por nosso grupo (Sebollela et al. 2012; Mendes et al. 2018; Fernandes et al. 2019). Resumidamente, incubou-se as fatias de 48 hpi com solução de MTT (0,5 mg/mL) por 3 h a 37°C. Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS e congeladas. Pouco antes da leitura espectrofotométrica, as fatias foram homogeneizadas em 200 µl de isopropanol/HCl 0,01 N e centrifugadas a 5000 rpm por 2 min. Os sobrenadantes foram coletados e a densidade óptica (O.D.) foi lida a 540 nm. Os valores foram normalizados pela massa de cada fatia. Nesse experimento, foi utilizado como controle positivo de morte celular 40 µM de actinomicina D (ActD).

3.8 – Ensaio da atividade da enzima citrato sintase

A atividade da enzima mitocondrial citrato sintase (CS) foi avaliada em fatias 48 hpi. As fatias foram homogeneizadas por três ciclos de 10 segundos em tampão

trietanolamina-HCl (0,1 M, pH 8,0), acetil-CoA 0,3 mM, oxaloacetato 0,5 mM, Triton X-100 a 0,25% e ácido 5, 5' - ditiobis-2-nitrobenzóico 0,1 mM DTNB (Catalão et al., 2017). Os homogenatos foram centrifugados (12000xg a 4 ° C, 10') e o sobrenadante foi coletado (Spinazzi et al., 2012). A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bradford, 1976). A reação (10') foi iniciada pela adição de 40 µg de proteína total em tampão Trietanolamina-HCl. A redução de CoA (a CoA-SH) formada durante a transformação do DNTB em ácido 2-nitro-5-benzóico (TNB) foi monitorada pela absorção em 412 nm (Srere 1969).

3.9 – ELISA para dosagem de citocinas

A análise da liberação de citocinas foi realizada 48 hpi, sendo utilizado como controle negativo culturas incubadas com mock. O meio condicionado desses tecidos foi armazenado a -80°C para posterior dosagem das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10. As dosagens por ELISA foram realizadas de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante do kit (BD OptiEIA, BD Biosciences), e normalizadas pela quantidade de proteína total da fatia (dosada pelo método de Bradford).

3.10 – Diferenciação celular da linhagem SH-SY5Y

A linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y foi cultivada em meio DMEM completoc com 4,5g/L de D-glucose, L-glutamina (Life Technologies), suplementado com 100U/L de penicilina e 0,1g/L de estreptomicina (Sigma)e 10% (v/v) de SFB (Gibco). Os poços com lamínula foram tratados com com 300µL/ poço de poli-lisina D a 0,1mg/mL (Sigma-Aldrich) em água milli-Q por 15 minutos na capela de fluxo laminar previamente ao plaqueamento. Foram plaqueadas 50.000 células por poço, e após 24h A retirou-se o meio DMEM completo e adicionou-se meio de diferenciação, composto por 0,5% de SFB (v/v), 100U/L de penicilina/0,1g/L de estreptomicina em

DMEM, acrescido de 10 μ M de ácido retinóico (All Trans-Retinoic acid, Sigma). As células foram cultivadas nessa condição por 96h em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Após, retirou-se o meio e adicionou-se novo meio DMEM de diferenciação, suplementado com 10 μ M de ácido retinóico e 50 ng/mL de BDNF (sigma). A placa permaneceu em incubadora por mais 96h. Durante esses 8 dias, o meio de diferenciação foi trocado a cada 48h. O acompanhamento da mudança morfológica das células e seus respectivos registros fotográficos foram realizados em microscópio invertido (Primo Vert, Zeiss), em objetiva com aproximação de 10x.

No oitavo dia, as células foram incubadas com o inóculo de OROV (M.O.I = 1) por 1 h a 4°C, sob agitação leve para adsorção das partículas virais a membrana plasmática. Após esse tempo, o inóculo foi removido, as monocamadas foram lavadas 3x com PBS e, em seguida, foi adicionado meio DMEM com 2% SFB a 37°C para permitir a entrada viral sincronizada. Posteriormente, as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ tendo início a contagem do tempo de infecção. Em diferentes tempos pós infecção, o sobrenadante e a monocamada celular foram coletados separadamente para quantificação dos títulos virais pelo ensaio de TCDI50. No tempo de 24 hpi foi feita uma imunofluorescência em lamínula para detecção de infecção viral dessa linhagem celular.

3.11 – Infecção por OROV *in vivo* em camundongos adultos

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 com 6 semanas de vida foram infectados pela via subcutânea com 10⁶ TCDI50 de OROV (N=2). As análises de expressão genica quantitativa (qPCR) em extratos de cérebro foram realizadas em 7, 14, 45 e 90 dias pós infecção (dpi). O cérebro foi coletado e macerado em Trizol Reagent (Invitrogen) e o RNA extraído, sendo que 1000 ng de cada amostra foram utilizados para a síntese de cDNA (High-Capacity cDNA Reverse Transcription). O

cDNA foi submetido a análise por qPCR (SYBR GREEN, KAPA BIOSYSTEMS) utilizando três pares de primers direcionados para regiões nos segmentos L, M E S do genoma de OROV. Cérebro de animais infectados também foram retirados e cortados em vibrátomo a 200µm, assim como descrito em 3.2. E seguida do processamento foram fixados por 24 h e o protocolo de imunofluorescência foi igual ao descrito em 3.9, para detecção de proteínas virais.

3.12 – Análise estatística

O ensaio de viabilidade celular por MTT foi analisado pelo teste One-Way-ANOVA. Todas as outras análises foram utilizando o teste t-Student. Ambas as análises foram feitas utilizando o programa GraphPrisma versão 6.0. Os resultados foram expressos como média aritmética $\pm$ erro padrão. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando apresentaram valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

4) RESULTADOS

4.1 – Susceptibilidade e permissividade das fatias cerebrais humanas adultas à infecção por OROV

Inicialmente, realizamos a padronização da infecção *ex vivo* por OROV nas fatias cerebrais humanas adultas. As fatias foram preparadas conforme descrito na seção 3.2 e infectadas conforme seção 3.3 com 3×10^6 TCID₅₀/μL ou igual volume de mock. A infectividade da fatia foi determinada pela visualização da presença de proteínas virais por imunofluorescência tanto em 24 horas pós infecção (hpi) quanto 48 hpi (Fig. 4A-I). É possível notar um aumento significativo no número de células infectadas em 48 hpi quando comparadas com as fatias em 24 hpi (Fig. 4J). Essas análises, portanto, mostram que algumas células nas fatias de cérebro humano adulto são susceptíveis à infecção por OROV. Pelo nosso conhecimento, esta é a primeira demonstração da capacidade do arbovírus OROV de infectar células neurais humanas.

Figura 4 - Infecção por OROV nas fatias cerebrais humanas adultas. As fatias cerebrais humanas adultas não infectadas (A-C) ou infectadas com OROV nos tempos de 24 hpi (D-F) ou 48 hpi (G-I) foram incubadas com anticorpo policlonal para proteínas virais (verde) e DAPI para núcleo (azul). (J) Quantificação de células infectadas em 24 e 48 hpi, evidenciando um aumento no número de célula infectadas em 48 hpi. A normalização foi feita contando-se a quantidade de núcleos totais utilizando-se o software Image J, e o resultado é mostrado como a média $\pm$ erro padrão. (n=3, 24 hpi; n=9, 48 hpi) (n = número de doadores), (*, $P < 0.05$; teste *t student*). Barra de escala = 20 μ m.

Após determinarmos a susceptibilidade das fatias cerebrais humanas à infecção por OROV, realizamos ensaios que pudessem mostrar a permissividade da infecção, ou seja, a capacidade das células neurais presentes nas fatias cerebrais de produzirem partículas virais infecciosas. Para isso, realizamos o ensaio de TCID₅₀, no qual coletamos o sobrenadante das fatias em 0 hpi (logo após a última lavagem), 48 hpi e 72 hpi para titulação em uma monocamada de células Vero. Observamos um aumento nos títulos em 48 hpi e 72 hpi, em relação a 0 hpi, indicando a produção de partículas virais pelas células neurais infectadas na fatia cerebral humana adulta (Fig.

5A). Pelo imageamento da monocamada das células Vero incubadas com os sobrenadantes das fatias na diluição de 10^{-2} , observamos a presença de efeito citopático apenas nas células Vero incubadas com os sobrenadante correspondente a 72 hpi e não com 0 hpi (Fig 5 B-C), indicando que o vírus titulado não é proveniente do estoque viral adicionado, mas sim de novas partículas produzidas pelas células infectadas.

Além da titulação viral, também buscamos visualizar a presença da partícula viral produzida pelas fatias cerebrais humanas infectadas experimentalmente, por microscopia eletrônica de transmissão. Primeiramente, realizamos a análise da fatia não infectada em DIV1, para analisarmos a morfologia do tecido no dia no qual a infecção é realizada. Observamos a presença de mitocôndrias com morfologia e cristas mitocondriais preservadas (setas vermelhas), assim como a de vesículas de neurotransmissores (seta azul), e de densidades pós-sinápticas (seta amarela) (Fig. 5D), indicando que o tecido no dia da infecção está bem preservado. Para avaliarmos a presença de partícula viral, fixamos o tecido em 48 hpi e visualizamos estruturas com aspecto de partículas virais produzidas pelas células da fatia (Fig. 5E-F). Mais experimentos agora são necessários para que possamos confirmar a identidade viral dessas estruturas.

Figura 5 - Produção de partículas virais em fatias cerebrais humanas adultas. (A) Titulação por TCID50 do sobrenadante das fatias após diferentes tempos de infecção (0, 48 e 72 hpi). A titulação foi normalizada pela massa (mg) de cada fatia. Imagens representativas do efeito citopático na monocamada de células Vero incubadas com sobrenadante das fatias (B) 0hpi e (C) 72 hpi, ambas na diluição 0,01. (D) Ultraestrutura da fatia em DIV1, com a presença de mitocôndrias preservadas (setas vermelhas), neurotransmissores (azul) e densidade pós-sináptica (amarela). (E, F) Estruturas com aspecto de partículas virais (setas laranjas) produzidas por células neurais humanas infectadas. (n = 3 fatias de um mesmo doador)

Os dados de titulação viral por TCID50 (Fig. 5A-C), e os dados iniciais de microscopia eletrônica (Fig. 5E-F), nos indicam, portanto que nosso modelo de fatias de cérebro humano é susceptível e permissivo à infecção por OROV.

4.2 –Neuropatogênese nas fatias cerebrais humanas infectadas por OROV

Após demonstrarmos que fatias cerebrais de humanos adultos podem ser infectadas com OROV, o próximo passo foi determinar as alterações patológicas decorrentes dessa infecção. A indução de morte celular em cultura de células HeLa e no cérebro de camundongos jovens em decorrência da infecção por OROV já foi mostrada, sendo que nas células HeLa esse processo de morte está associado a via mitocondrial (Acrani et al., 2010a; Santos et al., 2012). Para determinar se OROV seria capaz de induzir morte e dano mitocondrial nas fatias cerebrais humanas, avaliamos a viabilidade celular e o número de mitocôndrias em nosso modelo no tempo de 48 hpi.

Pela análise de viabilidade celular usando o ensaio de MTT, observamos uma redução significativa na viabilidade celular nas fatias infectadas comparadas ao mock (Fig. 6A), mostrando pela primeira vez que a infecção por OROV em células neurais humanas adultas pode resultar na morte dessas células. Analisamos também se a infecção por OROV modularia a densidade mitocondrial, por meio da dosagem da enzima citrato sintase, um biomarcador de densidade mitocondrial (Combs et al. 2020). Não observamos diferença significativa entre as fatias infectadas e o mock (Fig. 6B), apesar de parecer haver uma modulação positiva na densidade mitocondrial nas fatias infectadas.

Considerando a observada morte celular induzida pela infecção por OROV nas fatias humanas, decidimos avaliar também os níveis de algumas citocinas previamente relacionadas à resposta à infecção por vírus neurotrópicos como as citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , e a citocina anti-inflamatória IL-10 (Sulik et al. 2014; Bastos, et al. 2015; Rojas et al. 2017) em nosso modelo de fatias humanas infectadas por OROV. Observamos um aumento significativo nos níveis de TNF- α

nas fatias infectadas quando comparadas ao mock (Fig. 6C). Por outro lado, não detectamos diferenças significativas nos níveis de IFN- γ e IL-10 entre as fatias infectadas ou não (Fig. D-E). Esses dados indicam que a infecção por OROV em fatias cerebrais de humanos adultos resultou em liberação aumentada de uma citocina pró-inflamatória, além de demonstrar que as células residentes do SNC presentes em nosso modelo são capazes de produzir citocinas em resposta a um estímulo pró-inflamatório de forma independente de uma resposta imune periférica.

Figura 6 – Patogênese do OROV em fatias cerebrais humanas. Os ensaios foram realizados com fatias no tempo de 48 hpi. (A) Fatias infectadas com OROV apresentam menor viabilidade celular quando comparadas ao mock (considerado como 100% de viabilidade). Actinomicina D (ActD) foi utilizada como controle positivo para morte celular. (B) Dosagem da atividade da enzima citrato-sintase

(CS) em fatias infectadas e não infectadas. Não houve diferença significativa na atividade da CS entre as duas condições. (C) Dosagem das citocinas TNF- α , (D) IFN- γ e (E) IL-10 no meio de cultura das fatias em cultura. Houve aumento significativo apenas na liberação de TNF- α quando comparado ao mock. n=3 doadores para cada experimento; exceto na dosagem de CS, em que n= 4 fatias por condição, todas do mesmo doador). (** = $P < 0,001$; One Way ANOVA; * = $P < 0.05$, teste *T student*).

Portanto, com os resultados mostramos até agora, podemos afirmar que OROV é capaz de infectar e de ser produzido por células neurais em um modelo de fatias cerebrais de humanos adultos, e que a infecção é capaz de levar a alterações na viabilidade celular e liberação de citocina pró-inflamatória TNF- α . Portanto, para entendermos ainda mais a biologia da neuroinfecção e da neuropatogênese de OROV em células neurais humanas, decidimos determinar a infectividade desse vírus nas diferentes células neurais que compõem o nosso modelo de SNC humano.

4.3 – Identificação das células neurais humanas susceptíveis à infecção por OROV

Para avaliarmos o fenótipo celular infectado por OROV nas fatias cerebrais humanas, marcamos proteínas virais utilizando um anticorpo policlonal anti-OROV para detecção do vírus (Santos et al., 2008). Micróglia, neurônios e astrócitos foram identificados usando anticorpos monoclonais para Iba1, NeuN e GFAP, respectivamente. Observamos que tanto micróglia (Fig. 7A-E) quanto neurônios (Fig. 7F-J) são susceptíveis à infecção por OROV, mas não foi observada infecção em astrócitos (Fig. 7K-O). A quantificação do número de células infectadas em cada fenótipo neural revelou que, a despeito de os neurônios serem as células majoritárias nas fatias (aproximadamente 33%), em comparação a cerca de 10% de células Iba1 positivas (Fig. 7P), a micróglia apresenta cerca de 35% das células com marcação

para proteínas virais, enquanto apenas 2% das células NeuN positivas apresentaram também marcação para proteínas do OROV (Fig. 7Q).

Figura 7 – Susceptibilidade das principais células do SNC à infecção por OROV em fatias de cérebro humano adulto. A determinação do fenótipo celular infectado foi feita por imunofluorescência em fatias infectadas em DIV1 ou DIV5, e após 48 h de infecção, com marcação de núcleo (azul; A,F, K), proteínas virais (verde; B,G,L) e células neurais (vermelho): micróglia (Iba1, C), neurônio (NeuN, H) e astrócito (GFAP, M). Foi encontrada marcação de proteínas virais em células microgliais (D-E) e neuronais (I-J) infectadas por OROV, mas não em células astrocitárias (N, O). (P) Quantificação dos diferentes fenótipos celulares neurais em fatias cerebrais humanas. (Q) Percentual de células infectadas por OROV em cada fenótipo neural. (#) nenhuma célula astrocitária infectada. A normalização foi feita contando-se a quantidade de núcleos totais utilizando o software Image J. O resultado é mostrado como a média $\pm$ erro padrão. (n=5 pacientes, Iba1; n=4, NeuN; n=2, GFAP; n= número de doadores). Barra de escala = 20 μ m.

Apesar de OROV infectar majoritariamente células microgliais nas fatias de cérebro humano adulto, estudos anteriores em modelos animais indicaram infecção majoritariamente em células neuronais (Santos et al, 2012). A fim de descobrir se OROV seria capaz de ser infectar neurônios humanos, utilizamos células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas para neurônio maduro. As células SH-SY5Y incubadas com OROV apresentarem efeito citopático visível já com 24 hrs (Fig. 8A), sendo que em 36 e 48 hpi observamos que praticamente todas as células se encontram no sobrenadante (Fig 8B-C), a despeito das células incubadas com mock por 48 hpi, que ainda se encontravam aderidas (Fig 8D). A infecção de células neuronais humanas foi confirmada por detecção de proteínas virais por imunofluorescência (Fig. 8E), e produção de partículas virais infecciosas foi confirmada por titulação do sobrenadante e da monocamada de SHSY-5Y em células Vero, em diferentes tempos pós-infecção. A titulação mostrou que células neuronais produziram cerca de 10^6 TCID₅₀/μL em 36 hpi (Fig 8F). Os resultados obtidos pela curva de replicação obtida pela titulação corroboram com os efeitos citopáticos visualizados, visto que 36 e 48 hpi correspondem ao pico de produção viral titulada

(Fig. 8F) e são os tempos em que praticamente todas as células estão no sobrenadante (Fig. 7B-C)

Figura 8 – Infecção e produção de progênie viral por OROV em linhagem celular de neuroblastoma humano. Células da linhagem SH-SY5Y foram diferenciadas em neurônios maduros e infectadas pelo OROV em uma M.O.I=1. Efeito citopático na monocamada celular de SHSY-5Y infectada pelo OROV em (A) 24, (B) 36 e (C) 48 hpi. Quase todas as células são vistas em suspensão no sobrenadante a partir de 36 hpi (B), em contraste com a monocamada incubada com mock por 48 h (D), quando a maior parte das células ainda está aderida. (E) Células SH-SY5Y marcadas para proteínas virais (verde) e núcleo (azul), mostrando que OROV é capaz de infectar esse modelo. (F) Titulação viral (usando células Vero como repórter) do sobrenadante e da monocamada celular

coletados após diferentes tempos pós-infecção, demonstrando a produção de progênie viral por células neuronais humanas. Imagens de campo claro obtidas em objetivas de 20x.

4.4 – Neuroinfecção *in vivo* por OROV em modelo animal adulto de infecção

Nossos dados até aqui indicam que OROV é capaz de infectar e produzir progênie viral em em fatias de cérebro humano adulto, com resposta das células residentes a essa infecção. Dados anteriores obtidos em modelos murinos de infecção neonatal com OROV mostraram que os animais apresentam sintomas como letargia e paralisasia após 5 dias de infecção e que estes morrem dentro de até 10 dias; além disso em fases iniciais de infecção – em torno de 3 dias de infecção - podem o atingir o SNC através de rotas neurais e em fases mais tardias de também podem atravessar a barreira hemato-encefálica (Santos et al., 2012; 2014). Como não havia informações detalhadas sobre o curso da infecção por OROV em roedores adultos, iniciamos o desenvolvimento de um modelo *in vivo* de camundongos C57BL/6 adultos, os quais não apresentam sintomas clínicos diferentes em relação ao controle não infectado e nem parecidos com os sintomas descritos para em animais neonatos (doutado em andamento de Juliano de Paula Souza, dados não mostrados).

Avaliamos a detecção de proteínas virais por imunofluorescência no cérebro de animais 90 dias pós infecção (dpi) (Fig. 9A-B). Detectamos poucas células com marcação para proteína viral nos animais infectados, cerca de 1% das células infectadas a cada 100 células em um campo (Fig. 9C). Apesar do baixo número de células infectadas encontradas no cérebro dos camundongos infectados, os dados iniciais de quantificação de fenótipos neurais indicam que não há alterações no número de microglias e de neurônios no cérebro dos animais infectados comparados com o mock, mas parece haver aumento no número de astrócitos (Fig. 9D). Porém, apesar de não termos detectado alteração no número de células microgliais,

observamos uma diferença no perfil morfológico dessas células quando comparamos o cérebro animais mock e infectados, já que encontramos células com uma morfologia mais ramificada no cérebro dos animais não infectados, que chamamos de perfil 1 (Fig. 9E), em contraste com um perfil majoritariamente amebóide na microglia dos animais infectados, que denominamos de perfil 2 (Fig. 9F).

Figura 9. Neuroinfecção por OROV *in vivo* em camundongos C57BL/6 adultos. A detecção de proteína viral foi feita 90dpi em animais adultos infectados. (A-B) Células infectadas, marcadas para proteínas virais (verde) estão mostradas pelas setas brancas. (C) Quantificação das células infectadas em animais 90 dpi. (D) Quantificação de micróglias (Iba1) neurônios (NeuN) e astrócitos (GFAP) no cérebro de animal infectado e não infectado. Perfil de morfologia microglial ramificado majoritariamente

encontrado no mock (E) e perfil ameboide majoritariamente encontrado nos animais infectados (F). Núcleos foram marcados com DAPI (azul). n= 2-3 animais. Barra de escala = 20 μ m.

Apesar de não termos detectado uma intensa infecção de células nos cortes dos animais adultos infectados com OROV, dados preliminares de qPCR, obtidos de extratos de cérebro de animais de 7, 14, 45 e 90 dias pós infecção, indicam que 85% dos animais foram positivos para presença dos três segmentos do genoma de OROV (L, M e S) (doutorando Juliano P. Souza; dados não mostrados). Além da detecção de genoma viral, e da aparente neuroinflamação induzida pela infecção por OROV (astroglíose e uma ativação de microglia), dados iniciais de experimentos comportamentais de nosso grupo indicaram que animais infectados com OROV apresentam comportamento depressivo em relação ao controle mock (no Teste de nado forçado), além de uma maior sensibilidade a dor por estímulo mecânico (FAPESP #2016/06490; dados não mostrados).

Em conjunto, esses achados sugerem que há uma resposta concertada à infecção por OROV no SNC adulto, como uma tentativa de impedir a produção o espalhamento viral, mas que acaba resultando, via neuroinflamação, em prejuízo cognitivo nos animais. Até o momento, apenas cérebros de animais 90 dpi foram analisados para detecção de proteínas virais, e portanto, ainda é necessário realizar mais experimentos com esses animais, além de realizar essa detecção em períodos iniciais de infecção, assim como, também, experimentos que possam comprovar a neuroinflamação e sua relação com a patogênese de OROV no SNC adulto.

DISCUSSÃO

5) DISCUSSÃO

Esse trabalho buscou contribuir para o entendimento da neuroinfecção do vírus Oropouche utilizando um modelo de estudo *ex vivo* de fatias de cérebro humano adulto, em que avaliamos a capacidade desse vírus de infectar células neurais humanas obtidas de indivíduos adultos, e as alterações teciduais que decorrem dessa infecção. O modelo de fatias cerebrais humanas já foi padronizado por nosso grupo em trabalhos anteriores, nos quais mostramos que estas se encontram viáveis e funcionais por até 5DIV, com a preservação da citoarquitetura do tecido neural, e com a presença dos principais tipos celulares: neurônios, micróglia e astrócitos (Fig. 2) (Mendes et al., 2018; Fernandes et al., 2019), características importantes para que o modelo possa ser utilizado em estudos de neuropatogênese viral.

Modelos de histoculturas de tecido neural já foram usados em estudos de alguns vírus neurotrópicos, sendo que esses estudos se concentraram no desenvolvimento de um modelo de tecido neural murino neonato para os estudos da neuropatogênese decorrente à infecção, como culturas de tecido de medula espinhal para estudos de *Reovirus* e *West Nile* (Schittone et al, 2012; Quick et al, 2014) e de tecido cerebral no caso de *Herpes Simplex Virus type 1 (HSV1)* (Braun et al., 2006; Cohen et al, 2011). Estudos de infecção viral em modelo de tecido do SNC humano foram reportados em trabalho sobre a neuropatogênese do Vírus da Imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1), sendo que em um desses estudos, cérebro de fetos humanos foi co-cultivado com uma linhagem celular produzindo cronicamente o vírus (Martinez et al., 2011). A utilização da infecção viral em modelos de tecido neural humano adulto é voltada, principalmente, para o estudo de mecanismos moleculares e genéticos associados a expressão de alguma proteína codificada pelo genoma viral, utilizando o vírus apenas como uma ferramenta para este fim (Andersson et al., 2016;

Le et al., 2018; Ting et al., 2018; Croft et al., 2019). Um trabalho de um grupo brasileiro, utilizou recentemente esse modelo para mostrar que o vírus Zika é capaz de infectar e se replicar em células neurais humanas adultas (Figueiredo et al., 2019).

Nosso conhecimento, até aqui, mostra que este é o primeiro trabalho a utilizar um modelo de cérebro humano adulto para entender uma neuropatogênese de um vírus da família *Peribunyaviridae*. Alguns membros dessa família já são conhecidos por serem neutrópicos, como *La Crosse encephalitis* e *Rift valley fever*, por exemplo, que podem causar alterações neurológicas, como meningite e encefalite em pacientes infectados, e que pode resultar em óbito (Wasay et al, 2015; Wiley et al, 2015; Winkler et al., 2019). Porém, o vírus que aplicamos em nosso modelo, o OROV, é um vírus emergente do qual se sabe muito pouco acerca de sua patogênese.

Apesar de nenhum óbito estar associado à infecção por OROV, há relatos na literatura do isolamento de OROV do líquido de pacientes com sintomas de meningite (Pinheiro *et al.*, 1982), e mais recentemente, houve relatos de detecção de OROV por RT-PCR em três pacientes na Amazônia, dois dos quais com doenças que levam a imunossupressão, como neurocisticercose e HIV/Aids (Bastos et al., 2012). Em 2019, também houve um relato de uma meningoencefalite em um paciente imunocompetente que estava associada a infecção por OROV (Vernal et al, 2019). Nossos dados corroboram com esses relatos, associando complicações neurológicas à infecção por OROV, visto que mostramos que OROV é capaz de infectar células neurais humanas (Fig. 4). Além disso, mostramos que estas células também produzem progênie viral infectante (Fig. 5), o que pode agravar o quadro neurológico, visto que pode ocorrer o espalhamento das novas partículas virais pelo cérebro.

Os mecanismos que levam a neuroinvasão e a neurovirulência de vírus neurotrópicos não são completamente conhecidos, mas alguns estudos relatam a

invasão do SNC pela barreira hemato-encefálica, plexo-coroide via espaço subaracnóide, nervos periféricos e/ou neurônios sensoriais olfativos (Dahm et al, 2016). Ainda não sabe ao certo como OROV é capaz de atingir o SNC, mas um estudo usando modelo murino mostrou que em fases iniciais da infecção esse vírus utiliza principalmente a rota neural, enquanto que em fases que correspondem a viremia ele é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Santos et al., 2014b). Outro estudo mostra que OROV é capaz de infectar leucócitos do sangue periférico humano, e, portanto, poderia invadir o SNC humano pelo conhecido mecanismo de “cavalo de tróia” (de Souza Luna et al., 2017). O fato é que OROV consegue chegar ao SNC, mas o que acontece no cérebro humano adulto após essa infecção ainda é muito pouco compreendido.

No presente trabalhamos, mostramos que OROV diminui a viabilidade celular nas fatias de cérebro humano (Fig. 6A), o que poderia correlacionar com indução de morte celular, visto que em modelos murinos foi visto que OROV causa apoptose em células neuronais (Santos et al., 2012). Este mecanismo também já foi descrito em células HeLa, sendo que uma ou mais proteínas de OROV induz/induzem apoptose pela via intrínseca nas primeiras 4 h de infecção, com extravasamento de citocromo c das mitocôndrias para o citosol (Acrani et al., 2010b). Dados recentes obtidos pelo Laboratório coordenado pelo Prof. Eurico Arruda (FMRP-USP) mostram que a proteína NSs de OROV é um fator essencial para desencadear a apoptose em células HeLa, de maneira parácrina ou até mesmo autócrina (Oliveira, 2017).

Nossos dados mostram que, apesar de não haver uma diferença significativa na dosagem da enzima citrato-sintase mitocondrial nas fatias infectadas em relação ao controle, nós notamos uma um relativo aumento na dosagem dessa enzima nas (Fig. 6B), um marcador clássico de conteúdo mitocondrial (Williams et al, 1986;

Teodoro et al., 2017). Esse aumento poderia ser uma resposta das células neurais frente a uma infecção que estaria afetando a função mitocondrial, e, portanto, um aumento na quantidade dessa organela seria uma tentativa de manter as atividades celulares normais. Um aumento no número mitocondrial em resposta a situações de dano na atividade mitocondrial já foi relatado (Merz et al., 2015), dano este que poderia também estar associado com a proteína NSs de OROV, por exemplo, já que esta poderia possuir atividade parecida com a proteína NSs de um vírus pertencente a ordem *Bunyavirales*, a mesma de OROV, e que co-localiza com a mitocôndria e leva ao rompimento da membrana mitocondrial, com consequente alteração do potencial de membrana desta (Barnwal et al, 2016).

A infecção por OROV em nosso modelo *ex vivo* de cérebro humano adulto também mostrou que a população de células residentes do SNC foi capaz de responder a infecção, preservando uma resposta imune inata independente da imunidade periférica presente *in vivo*. Dosamos três importantes citocinas típicas da resposta a infecção no SNC: TNF- α , IFN- γ e IL-10 (Sulik et al. 2014; Bastos, et al. 2015; Rojas et al. 2017), porém sabemos que ainda se faz necessário investigar a resposta a IFN após infecção por OROV, visto que esta parece ser importante na neuropatogenicidade viral, já animais deficientes em IRF5 (um fator de regulação de IFN) apresentam um aumento da neuroinvasão viral (Proença-Módena et al, 2016).

Nossos dados mostraram aumento significativo na liberação de TNF- α no sobrenadante de fatias infectadas (Fig. 6C). É sabido que pacientes que fazem o uso de medicamentos bloqueadores da ação do TNF- α , por exemplo, possuem um risco maior de infecção por vários vírus, visto que essa citocina é liberada pelo hospedeiro para tentar controlar a infecção (Kim & Solomon, 2010). Por outro lado, há infecções em que o aumento dessa citocina está associado ao aumento da permeabilidade da

barreira hemato-encefálica, como na infecção por *La Crosse*, por exemplo, o que poderia agravar ainda mais o quadro infeccioso (Dawes et al., 2018). Em relação a OROV, a dosagem de citocinas do soro de pacientes infectados por OROV, ou seja, da resposta imune periférica a essa infecção, mostra que a produção de TNF- α em pacientes imunocompetentes e infectados (porém sem relatos de complicações neurológicas) é diminuída em relação a pacientes não infectados, assim como também foi menor a detecção de IFN- γ e IL-10 (de Oliveira et al., 2019). A liberação de citocinas IFN- γ e IL-10 possui importante papel na resposta a infecção virais no SNC (Chesler et al, 2002; Rojas et al, 2017; Savarin et al, 2018; Uhde et al., 2018), mas nossos dados mostram que não há alterações significativas na produção destas nas fatias infectadas, em relação ao controle não infectada (Fig. 6D-E). Portanto, apesar de relatos na literatura mostrarem que infecções por arboviroses em pacientes imunocompetentes levam a baixos níveis de citocinas no líquido cefalorraquidiano (Bastos et al., 2015), nós mostramos que células residentes do SNC humano, sem a interferência da imunidade periférica, são capazes de responder a infecção por OROV resultando em um aumento da liberação de TNF- α . Dados com modelos animais Uma proteína que parece ser importante para a neuropatogenicidade viral trabalho em modelo animal mostrou que IFN

Os dados de infecção por OROV *in vivo* em modelos murinos neonatos revelam uma susceptibilidade maior da infecção em células neuronais em relação a micróglia e astrócitos (Rodrigues et al., 2011; Santos et al., 2012). Porém, nossos dados de infecção em fatias cerebrais humanas adultas mostram uma susceptibilidade maior da micróglia à infecção por OROV, seguido de uma susceptibilidade menor de neurônios, e ausência da detecção de infecção em células astrócitárias (Fig. 7). Quando infectamos uma cultura celular (SH-SY5Y) diferenciada para um fenótipo de

neurônio maduro, observamos susceptibilidade a infecção por OROV, além da produção de altos títulos virais (cerca de 10^6 TCID₅₀/100μL em 36 hpi) e indução de efeitos citopáticos decorrentes da infecção por OROV (Fig. 8). Portanto, podemos concluir que neurônios humanos são susceptíveis a infecção por OROV, porém, em um modelo que mantém a citoarquitetura do tecido cerebral humano, as células microgliais foram preferencialmente infectadas. Essa maior infecção pode resultar de um mecanismo de defesa preservado em nosso modelo *ex vivo*, em que micróglias respondem a infecção e fagocitam esse vírus, sendo que esse mecanismo de defesa já foi observado em um modelo *ex vivo* de fatias cerebrais murinas infectadas por WNV (Quick et al., 2014; Quick et al, 2017). Talvez, por isso, seja difícil haver uma neuroinfecção por OROV em pacientes imunocompetentes, visto que tanto a resposta imune periférica, quanto a resposta gerada pelas próprias células residentes do SNC, pode agir para controlar a neuroinfecção. Nossos dados utilizando um modelo murino adulto e imunocompetente de infecção *in vivo* por OROV estão de acordo com essa hipótese, já que detectamos poucas células neurais infectadas (Fig. 9A-C). Porém, outro ponto a ser levantado é o aumento de células astrocíticas e uma notável mudança de perfil morfológico microglial nos animais infectados (Fig. 9D-F). Esses resultados iniciais podem indicar uma neuroinflamação associada a infecção, e que esta esteja controlando a disseminação viral e a produção de proteínas virais pelas células infectadas, visto que há detecção de genoma viral nesses animais em até 90 dpi, e que animais infectados apresentam performance alterada em relação ao controle em testes comportamentais de sensibilidade a dor e de comportamento semelhante à depressão (doutorando Juliano P. Souza, dados não publicados). Porém, essa hipótese de neuroinflamação controlando espalhamento viral ainda precisa ser melhor investigada, o que poderia ser feito pela depleção de micróglias

em nosso modelo *ex vivo* de cérebro humano adulto, ou ainda infectando animais adultos imunocomprometidos para ensaios *in vivo*.

Sabemos que, apesar das similaridades entre roedores e humanos, há diferenças significativas que podem interferir nas respostas celulares e moleculares, impactando a pesquisa translacional, visto que os achados obtidos em modelos de roedores nem sempre são aplicáveis em seres humanos (Mestas & Hughes, 2004). Já o modelo de células em 2D ou até mesmo 3D não representam fielmente as conexões celulares de um tecido humano, e portanto, tecidos obtidos de humanos podem ser um excelente modelo para diversos estudos (Pacittiet al, 2019; Qi et al., 2019; Ravi et al., 2019). Aqui, utilizamos esse modelo, com a citoarquitetura de um tecido nervoso e suas conexões celulares preservadas, para estudar a infecção pelo OROV no SNC humano. Com esse trabalho, mostramos que OROV infecta células neurais humanas adultas e é capaz de induzir alterações teciduais, o que pode se correlacionar a complicações neurológicas encontradas em alguns pacientes infectados por OROV. Além disso, esse trabalho também abre perspectivas para que fatias de cérebro humano adulto cultivadas em *free-floating* também possam ser utilizadas para estudos de neuropatogênese associada a neuroinfecções virais.

CONCLUSÃO

6) CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que o vírus Oropouche infecta células neurais humanas em um modelo de fatias de cérebro humano adulto cultivadas em *free-floating*, sendo que as células microgliais e neuronais são susceptíveis a infecção. Além disso, essa infecção experimental resulta em aumento da liberação de TNF- α e a uma redução na viabilidade celular nas fatias de cérebro humano infectadas. E por fim, que ensaios *in vivo* de infecção por OROV em camundongos adultos imunocompetentes resulta em pouca detecção de células infectadas, mas que isso pode estar acompanhado de uma neuroinflamação central que pode resultar em danos neurológicos. Assim, concluímos que o vírus Oropouche pode causar patologias no SNC humano adulto e que nosso modelo de fatias de cérebro humano adulto cultivados em *free-floating* pode ser utilizado para estudos de neuropatogênese decorrentes de infecções virais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Acrani, Gustavo Olszanski et al. 2010a. "Apoptosis Induced by Oropouche Virus Infection in HeLa Cells Is Dependent on Virus Protein Expression." *Virus Research* 149(1): 56–63.
- Anderson, C.R, L. Spence, W. G. Downs, and T.H.G Aitken. 1961. "Oropouche Virus: A New Human Disease Agent from Trinidad, West Indies*." *American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 10: 574–78.
- Andersson, My et al. 2016. "Optogenetic Control of Human Neurons in Organotypic Brain Cultures." *Scientific Reports* 6(November 2015): 1–5.
<http://dx.doi.org/10.1038/srep24818>.
- Anti-inflammatory, Minocycline Has et al. 2017. "Crossm Vivo Spinal Cord Slice Culture Model Of." 91(22): 1–13.
- Barbosa, Natalia S. et al. 2018. "ESCRT Machinery Components Are Required for Orthobunyavirus Particle Production in Golgi Compartments." *PLoS Pathogens* 14(5): 1–21.
- Barnwal, Bhaskar, Helen Karlberg, Ali Mirazimi, and Yee Joo Tan. 2016. "The Non-Structural Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Disrupts the Mitochondrial Membrane Potential and Induces Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 291(2): 582–92.
- Bastos, Michele De Souza et al. 2012. "Short Report: Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the Cerebrospinal Fluid of Three Patients in the Amazonas, Brazil." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 86(4): 732–35.
- Bastos, Michele Souza, Jordana Graziela Coelho-dos-reis, et al. 2015. "Divergent Cerebrospinal Fluid Cytokine Network Induced by Non-Viral and Different Viral Infections on the Central Nervous System." *BMC Infectious Diseases*: 1–9.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-1035-4>.
- Bastos, Michele Souza, Jordana Graziela Coelho-dos-Reis, et al. 2015. "Divergent Cerebrospinal Fluid Cytokine Network Induced by Non-Viral and Different Viral Infections on the Central Nervous System." *BMC Infectious Diseases* 15(1): 1–9.

<http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-1035-4>.

- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72(1–2): 248–54.
- Braun, Efrat et al. 2006. "Neurotropism of Herpes Simplex Virus Type 1 in Brain Organ Cultures." *The Journal of general virology* 87(Pt 10): 2827–37.
- Brewer, G J et al. 2001. "Culture and Regeneration of Human Neurons after Brain Surgery." *Journal of neuroscience methods* 107(1–2): 15–23.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11389937>.
- Catalão, Carlos Henrique Rocha et al. 2017. "Brain Oxidative Stress During Experimental Sepsis Is Attenuated by Simvastatin Administration." *Molecular Neurobiology* 54(9): 7008–18.
- Chesler, David A., and Carol Shoshkes Reiss. 2002. "The Role of IFN- γ in Immune Responses to Viral Infections of the Central Nervous System." *Cytokine and Growth Factor Reviews* 13(6): 441–54.
- Cohen, Meytal et al. 2011. "Restrictions That Control Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Mouse Brain Ex Vivo." *Journal of General Virology* 92(10): 2383–93.
- Combs, Joseph A et al. 2020. "Crossm Human Cytomegalovirus Alters Host Cell Mitochondrial Function during Acute Infection." 94(2): 1–19.
- da Costa, Vivaldo Gomes et al. 2017. "Silent Emergence of Mayaro and Oropouche Viruses in Humans in Central Brazil." *International Journal of Infectious Diseases* 62(2017): 84–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.07.016>.
- Croft, Cara L. et al. 2019. "RAAV-Based Brain Slice Culture Models of Alzheimer's and Parkinson's Disease Inclusion Pathologies." *Journal of Experimental Medicine* 216(3): 539–55.
- Dahm, Tobias et al. 2016. "Neuroinvasion and Inflammation in Viral Central Nervous System Infections." *Mediators of Inflammation* 2016.
- Dawes, Brian E. et al. 2018. "Human Neural Stem Cell-Derived Neuron/Astrocyte Co-Cultures Respond to La Crosse Virus Infection with Proinflammatory Cytokines

- and Chemokines.” *Journal of neuroinflammation* 15(1): 315.
- Elliott, Richard M. et al. 2013. “Establishment of a Reverse Genetics System for Schmallenberg Virus, a Newly Emerged Orthobunyavirus in Europe.” *Journal of General Virology* 94(PART4): 851–59.
- Elliot, Richard M. 2014. “Orthobunyaviruses: Recent Genetic and Structural Insights.” *Nature reviews. Microbiology* 12(10): 673–85. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3332>.
- Eugène, Emmanuel et al. 2014. “An Organotypic Brain Slice Preparation from Adult Patients with Temporal Lobe Epilepsy.” *Journal of Neuroscience Methods* 235: 234–44.
- Fernandes, Artur et al. 2019. “Short-Term Free-Floating Slice Cultures from the Adult Human Brain.” *Journal of visualized experiments : JoVE* (153): 1–9.
- Fever, Oropouche et al. 2007. “Reemergence Of.” 13(6): 1–4.
- Figueiredo, Claudia P. et al. 2019. “Zika Virus Replicates in Adult Human Brain Tissue and Impairs Synapses and Memory in Mice.” *Nature Communications* 10(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11866-7>.
- Figueiredo, Luiz Tadeu Moraes. 2007. “Emergent Arboviruses in Brazil.” *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(2): 224–29.
- Gähwiler, B. H. et al. 1997. “Organotypic Slice Cultures: A Technique Has Come of Age.” *Trends in Neurosciences* 20(10): 471–77.
- Gähwiler, B. H. 1981. “Organotypic Monolayer Cultures of Nervous Tissue.” *Journal of Neuroscience Methods*.
- Gibrail, Marize Moreira et al. 2016. “Detection of Antibodies to Oropouche Virus in Non-Human Primates in Goiânia City, Goiás.” *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 49(3): 357–60.
- Healy, Sinead, Jill McMahon, Peter Owens, and Una FitzGerald. 2016. “Significant Glial Alterations in Response to Iron Loading in a Novel Organotypic Hippocampal Slice Culture Model.” *Scientific Reports* 6(1): 36410. <http://www.nature.com/articles/srep36410>.
- Hellmann, Anna Maria et al. 2017. “Human and Murine Innate Immune Cell

- Populations Display Common and Distinct Response Patterns during Their in Vitro Interaction with the Pathogenic Mold *Aspergillus Fumigatu*." *Frontiers in Immunology* 8(DEC): 1–11.
- Henry, R.; Murphy, F.A. 2018. "Oropouche [O'ro-Poo"che] Virus." 24(5): 30329.
- Hover, Samantha et al. 2018. "Bunyavirus Requirement for Endosomal K⁺reveals New Roles of Cellular Ion Channels during Infection." *PLoS Pathogens* 14(1): 1–21.
- Humpel, C. 2015. "Neuroscience Forefront Review Organotypic Brain Slice Cultures: A Review." *Neuroscience* 305: 86–98.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.086>.
- Humpel, Christian. 2015. "Organotypic Vibrosections from Whole Brain Adult Alzheimer Mice (Overexpressing Amyloid-Precursor-Protein with the Swedish-Dutch-Iowa Mutations) as a Model to Study Clearance of Beta-Amyloid Plaques." *Frontiers in Aging Neuroscience* 7(MAR): 1–10.
- Jeong, Gi Seok et al. 2015. "Networked Neural Spheroid by Neuro-Bundle Mimicking Nervous System Created by Topology Effect." *Molecular brain* 8: 17.
- Kim, Hyunjeong et al. 2013. "Organotypic Hippocampal Slice Culture from the Adult Mouse Brain: A Versatile Tool for Translational Neuropsychopharmacology." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 41: 36–43.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.11.004>.
- Kim, Seo Young, and Daniel H. Solomon. 2010. "Tumor Necrosis Factor Blockade and the Risk of Viral Infection." *Nature Reviews Rheumatology* 6(3): 165–74.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2009.279>.
- Le, Caroline et al. 2018. "Imaging Pathological Activities of Human Brain Tissue in Organotypic Culture." *Journal of Neuroscience Methods* 298: 33–44.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.02.001>.
- Martinez, Ricardo, Daniel Eraso, Rebeca Geffin, and Micheline McCarthy. 2011. "A Two-Culture Method for Exposure of Human Brain Organotypic Slice Cultures to Replicating Human Immunodeficiency Virus Type 1." *Journal of Neuroscience Methods*.

- Mendes, Niele D et al. 2018. "Free- Fl Oating Adult Human Brain-Derived Slice Cultures as a Model to Study the Neuronal Impact of Alzheimer ' s Disease- Associated A β Oligomers." 307(March): 203–9.
- Merz, Tobias M. et al. 2015. "Changes in Mitochondrial Enzymatic Activities of Monocytes during Prolonged Hypobaric Hypoxia and Influence of Antioxidants: A Randomized Controlled Study." *Redox Report* 20(5): 234–40.
- Mestas, Javier, and Christopher C. W. Hughes. 2004a. "Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology." *The Journal of Immunology* 172(5): 2731–38.
- Mestas, Javier, and Christopher C W Hughes. 2004b. "Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172(5): 2731–38.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978070>.
- Mewes, Agneta, Heike Franke, and David Singer. 2012. "Organotypic Brain Slice Cultures of Adult Transgenic P301S Mice-A Model for Tauopathy Studies." *PLoS ONE* 7(9).
- Miller, Jeremy A., Steve Horvath, and Daniel H. Geschwind. 2010. "Divergence of Human and Mouse Brain Transcriptome Highlights Alzheimer Disease Pathways." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(28): 12698–703. <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0914257107>.
- Mourão, Maria Paula G. et al. 2009. "Oropouche Fever Outbreak, Manaus, Brazil, 2007–2008." *Emerging Infectious Diseases* 15(12): 2063–64.
- Van Noort, Johannes M. 2006. "Human Glial Cell Culture Models of Inflammation in the Central Nervous System." *Drug Discovery Today* 11(1–2): 74–80.
- Nunes, Roberto Marcio Teixeira et al. 2007. "A Febre Do Oropouche: Uma Revisão Dos Aspectos Epidemiológicos e Moleculares Na Amazônia Brasileira." *Cadernos de Saúde Coletiva* 15(3): 303–18.
- de Oliveira, Euzébio et al. 2019. "IFN- α as a Time-Sensitive Biomarker during Oropouche Virus Infection in Early and Late Seroconverters." *Scientific Reports* 9(1): 1–9.

- Pacitti, Dario, Riccardo Privolizzi, and Bridget E. Bax. 2019. "Organs to Cells and Cells to Organoids: The Evolution of In Vitro Central Nervous System Modelling." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13(April): 1–22.
- Pham, Anh H., and David C. Chan. 2014. 547 Methods in Enzymology *Analyzing Mitochondrial Dynamics in Mouse Organotypic Slice Cultures*. 1st ed. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801415-8.00007-2>.
- Pinheiro, F P et al. 1982. "Transmission of Oropouche Virus from Man to Hamster by the Midge *Culicoides Paraensis*." *Science (New York, N. Y.)* 215(5): 1251–53.
- Pinheiro, FP, M Pinheiro, G Bensabath, and OR Causey. 1962. "Epidemia de Vírus Oropouche Em Belém." *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública* 12(1): 15–23.
http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Epidemia+de+v?rus+Oropouche+em+Bel?m+*#0.
- Pinheiro, Francisco P. et al. 1982. "Transmission of Oropouche Virus from Man to Hamster by the Midge *Culicoides Paraensis*." *Science* 215(4537): 1251–53.
- Pinheiro, Francisco P, Alfred L Hoch, Maria D E Lourdes C Gomes, and R Roberts. 1981. "BYCuLicowEs PARAENSIS *." *Tropical Medicine* 30(1): 172–76.
- Proenca-modena, Jose Luiz et al. 2016. "Orthobunyavirus Dissemination to the Central Nervous System." 90(1): 189–205.
- Proenca-Modena, Jose Luiz et al. 2015. "Oropouche Virus Infection and Pathogenesis Are Restricted by MAVS, IRF-3, IRF-7, and Type I Interferon Signaling Pathways in Nonmyeloid Cells." *Journal of Virology* 89(9): 4720–37.
- Qi, Xin-rui, Ronald W H Verwer, and Ai-min Bao Rawien. 2019. "Human Brain Slice Culture : A Useful Tool to Study Brain Disorders and Potential Therapeutic Compounds." *Neuroscience Bulletin*. <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0328-1>.
- Quick, E. D., J. S. Leser, P. Clarke, and K. L. Tyler. 2014. "Activation of Intrinsic Immune Responses and Microglial Phagocytosis in an Ex Vivo Spinal Cord Slice Culture Model of West Nile Virus Infection." *Journal of Virology* 88(22): 13005–14.
- Ravi, Vidhya M. et al. 2019. "Human Organotypic Brain Slice Culture: A Novel

- Framework for Environmental Research in Neuro-Oncology.” *Life Science Alliance* 2(4): 1–15.
- Retallack, Hanna et al. 2016. “Zika Virus Cell Tropism in the Developing Human Brain and Inhibition by Azithromycin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(50): 14408–13.
<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1618029113>.
- Rodrigues, Alcir Humberto et al. 2011a. “Oropouche Virus Experimental Infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus Auratus*).” *Virus Research* 155(1): 35–41.
- Rojas, José M., Miguel Avia, Verónica Martín, and Noemí Sevilla. 2017. “IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections.” *Journal of Immunology Research* 2017: 1–14.
- Romero-Alvarez, Daniel, and Luis E. Escobar. 2018. “Oropouche Fever, an Emergent Disease from the Americas.” *Microbes and Infection* 20(3): 135–46.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.013>.
- Sakkas, Hercules, Petros Bozidis, Ashley Franks, and Chrissanthy Papadopoulou. 2018. “Oropouche Fever: A Review.” *Viruses* 10(4): 1–16.
- Santos, Rodrigo I. et al. 2012. “Experimental Infection of Suckling Mice by Subcutaneous Inoculation with Oropouche Virus.” *Virus Research* 170(1–2): 25–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.07.006>.
- Santos, Rodrigo I., Lézio S. Bueno-Júnior, et al. 2014a. “Spread of Oropouche Virus into the Central Nervous System in Mouse.” *Viruses* 6(10): 3827–36.
- Santos, Rodrigo I M et al. 2008. “Oropouche Virus Entry into HeLa Cells Involves Clathrin and Requires Endosomal Acidification.” *Virus Research* 138(1–2): 139–43.
- Savarin, Carine, and Cornelia C. Bergmann. 2018. “Fine Tuning the Cytokine Storm by IFN and IL-10 Following Neurotropic Coronavirus Encephalomyelitis.” *Frontiers in immunology* 9(December): 3022.
- Schindelin, Johannes et al. 2012. “Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis.” *Nature Methods* 9(7): 676–82.

- Schittone, S. A., K. R. Dionne, K. L. Tyler, and P. Clarke. 2012. "Activation of Innate Immune Responses in the Central Nervous System during Reovirus Myelitis." *Journal of Virology* 86(15): 8107–18.
- Sebollela, Adriano et al. 2012. "Amyloid-?? Oligomers Induce Differential Gene Expression in Adult Human Brain Slices." *Journal of Biological Chemistry* 287(10): 7436–45.
- Silva-Caso, Wilmer et al. 2019. "First Outbreak of Oropouche Fever Reported in a Non-Endemic Western Region of the Peruvian Amazon: Molecular Diagnosis and Clinical Characteristics." *International Journal of Infectious Diseases* 83: 139–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.04.011>.
- de Souza Luna, Luciano Kleber et al. 2017. "Oropouche Virus Is Detected in Peripheral Blood Leukocytes from Patients." *Journal of Medical Virology* 89(6): 1108–11.
- Spinazzi, Marco et al. 2012. "Assessment of Mitochondrial Respiratory Chain Enzymatic Activities on Tissues and Cultured Cells." *Nature Protocols* 7(6): 1235–46.
- Srere, P. A. 1969. "[1] Citrate Synthase. [EC 4.1.3.7. Citrate Oxaloacetate-Lyase (CoA-Acetylating)]." *Methods in Enzymology* 13(C): 3–11.
- Stoppini, L., P. A. Buchs, and D. Muller. 1991. "A Simple Method for Organotypic Cultures of Nervous Tissue." *Journal of Neuroscience Methods*.
- Sulik, A., A. Kroten, M. Wojtkowska, and E. Oldak. 2014. "Increased Levels of Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Children with Aseptic Meningitis Caused by Mumps Virus and Echovirus 30." *Scandinavian Journal of Immunology* 79(1): 68–72.
- Teixeira Nunes, Márcio Roberta et al. 2005. "Oropouche Virus Isolation, Southeast Brazil." *Emerging Infectious Diseases* 11(10): 1610–13.
- Teodoro, Bruno G. et al. 2017. "Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 6 Regulates Lipid Synthesis and Mitochondrial Oxidative Capacity in Human and Rat Skeletal Muscle." *Journal of Physiology* 595(3): 677–93.
- Tilston-Lunel, Natasha L. et al. 2015. "Genetic Analysis of Members of the Species

- Oropouche Virus and Identification of a Novel M Segment Sequence." *Journal of General Virology* 96(7): 1636–50.
- Ting, Jonathan T. et al. 2018. "A Robust Ex Vivo Experimental Platform for Molecular-Genetic Dissection of Adult Human Neocortical Cell Types and Circuits." *Scientific Reports* 8(1): 1–13. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-26803-9>.
- Travassos Da Rosa, Jorge Fernando et al. 2017. "Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 96(5): 1019–30.
- Uhde, Ann Kathrin et al. 2018. "Intact Interleukin-10 Receptor Signaling Protects from Hippocampal Damage Elicited by Experimental Neurotropic Virus Infection of SJL Mice." *Scientific Reports* 8(1): 1–13.
- Verhoog, M. B. et al. 2013. "Mechanisms Underlying the Rules for Associative Plasticity at Adult Human Neocortical Synapses." *Journal of Neuroscience* 33(43): 17197–208. <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3158-13.2013>.
- Vernal, Sebastian, and Camila C R Martini. 2019. "Oropouche Virus–Associated Aseptic Meningoencephalitis, Southeastern Brazil." 25(2): 380–82.
- Walter, Cheryl T., and John N. Barr. 2011. "Recent Advances in the Molecular and Cellular Biology of Bunyaviruses." *Journal of General Virology* 92(11): 2467–84.
- Wasay, M., M.M. Mehndiratta, P. Mehndiratta, and N.S. Gulati. 2015. "Global Perspectives." *Neurology* 83(9): 1022–25.
- Wiley, Clayton A., Nitin Bhardwaj, Ted M. Ross, and Stephanie J. Bissel. 2015. "Emerging Infections of CNS: Avian Influenza A Virus, Rift Valley Fever Virus and Human Parechovirus." *Brain Pathology* 25(5): 634–50.
- Williams, R. S. et al. 1986. "Regulation of Nuclear and Mitochondrial Gene Expression by Contractile Activity in Skeletal Muscle." *Journal of Biological Chemistry* 261(1): 376–80.
- Winkler, Clayton W et al. 2019. "Neuronal Maturation Reduces the Type I IFN Response to Orthobunyavirus Infection and Leads to Increased Apoptosis of

Human Neurons.” 1: 1–16.

Wise, Emma L et al. 2019. “Oropouche Virus Cases Identified in Ecuador Using an Optimised RRT-PCR Informed by Metagenomic Sequencing.” (July).
<http://dx.doi.org/10.1101/683953>.

ANEXOS

ANEXO I – Artigo publicado em maio de 2018 no Journal of Neuroscience Methods

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroscience Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneumeth

Free-floating adult human brain-derived slice cultures as a model to study the neuronal impact of Alzheimer's disease-associated A β oligomers

Niele D. Mendes^{a,b}, Artur Fernandes^{a,c}, **Glaucia M. Almeida^a**, Luis E. Santos^d, Maria Clara Selles^d, N.M. Lyra e Silva^d, Carla M. Machado^e, José A.C. Horta-Júnior^e, Paulo R. Louzada^f, Fernanda G. De Felice^{d,g}, Soniza Alves-Leon^h, Jorge Marcondes^h, João Alberto Assirati Jr.ⁱ, Caio M. Matiasⁱ, William L. Klein^j, Norberto Garcia-Cairasco^c, Sergio T. Ferreira^{d,k}, Luciano Neder^{b,l}, Adriano Sebollela^{a,*}

^a Dept. Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, SP, Brazil

^b Dept. Pathology and Forensic Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, SP, Brazil

^c Dept. Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, SP, Brazil

^d Institute of Medical Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Department of Anatomy, Institute of Biosciences, São Paulo State University, SP, Brazil

^f Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^g Centre for Neuroscience Studies, Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston, ON, Canada

^h Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ⁱ Ribeirão Preto Medical School Clinical Hospital, University of São Paulo, SP, Brazil

^j Department of Neurobiology, Northwestern University, IL, USA

^k Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^l Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil

ANEXO II – Artigo publicado em novembro de 2019 no Journal of Visualized Experiments

Video Article

Short-Term Free-Floating Slice Cultures from the Adult Human Brain

Artur Fernandes^{1,2}, Niele Dias Mendes^{1,3}, **Glaucia Maria Almeida¹**, Giovanna Orlovski Nogueira¹, Carla de Moraes Machado⁴, Jose de Anchieta de Castro Horta-Junior⁴, João Alberto Assirati Junior⁵, Norberto Garcia-Cairasco², Luciano Neder³, Adriano Sebollela¹

¹Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo

²Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo

³Department of Pathology and Forensic Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo

⁴Department of Anatomy, Institute of Biosciences, São Paulo State University

⁵Clinical Hospital at the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo

Correspondence to: Adriano Sebollela at sebollela@fmrp.usp.br

URL: <https://www.jove.com/video/59845>

DOI: [doi:10.3791/59845](https://doi.org/10.3791/59845)

Keywords: Neuroscience, Issue 153, histoculture, neocortex, ex vivo, neurodegeneration, epilepsy, Alzheimer's

Date Published: 11/5/2019

Citation: Fernandes, A., Mendes, N.D., Almeida, G.M., Nogueira, G.O., Machado, C.d., Horta-Junior, J.d., Assirati Junior, J.A., Garcia-Cairasco, N., Neder, L., Sebollela, A. Short-Term Free-Floating Slice Cultures from the Adult Human Brain. *J. Vis. Exp.* (153), e59845, doi:10.3791/59845 (2019).