

**CRISTINE MARIE YDE OHKI**

**Avaliação da infecção do Zika vírus em astrócitos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão-Braga

Versão Original

São Paulo  
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Ohki, Cristine Marie Yde  
Avaliação da infecção do Zika virus em astrócitos /  
Cristine Marie Yde Ohki; orientadora Patrícia  
Cristina Baleeiro Beltrão-Braga. -- São Paulo, 2019.  
84 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Zika virus. 2. Astrócitos. 3. Células-tronco  
pluripotentes induzidas. 4. Microcefalia. 5.  
Sistema nervoso central. I. Beltrão-Braga, Patrícia  
Cristina Baleeiro, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidata: Cristine Marie Yde Ohki

Título da Dissertação/Tese: Avaliação da infecção do Zika vírus em astrócitos

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão-Braga

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou a candidata:

(    ) **Aprovado(a)**                      (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



Cidade Universitária "Américo de Sáles Oliveira" Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000  
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone: (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 26 de julho de 2017.

**PARECER 1345/CEPSH**

CAAE nº 69938317.7.0000.5467


Protocolo CEPSH-ICB nº 1389/17

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **Aprovou** o projeto intitulado: "**AValiação DA INFECCÃO DO ZIKA VíRUS EM ASTRÓCITOS**", dos pesquisadores Prof. Dr. **Patricia Cristina Baleciro Beltrão Braga** e da aluna **Cristine Marie Yde Ohki**.

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: [www.icb.usp.br](http://www.icb.usp.br), como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto. Ressalta-se que a validade do projeto é definida pelo cronograma apresentado pelos pesquisadores na Plataforma Brasil.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria do CEP em **26/07/2018**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,



Prof. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisas em Seres Humanos - ICB/USP

À minha tia Lúcia e ao meu avô Arata (*in memoriam*), meus exemplos de garra e caráter que, de onde estiverem, seguem me protegendo. Meu amor por vocês é eterno.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela oportunidade de crescer neste curso de pós-graduação.

À minha família: meus pais, minha tia Lúcia e meus avós Eliza e Arata, por acreditarem em mim, me darem o suporte necessário para enfrentar todos os desafios da vida e me ensinarem princípios essenciais.

À Patrícia Braga, por confiar na minha capacidade, pela amizade de sempre e contribuição para minha formação científica.

Às minhas colegas de trabalho do Laboratório de Modelagem de Doenças (Fabiele, Cecília, Anita, Andreilissa e Ariane), por todo o apoio. Um "muito obrigada" especial às queridas Fernanda e Kátia, não só por me guiarem profissionalmente nessa jornada científica, mas também por todo o alicerce emocional que me deram... Nossa amizade é incondicional e inabalável.

À Isabella Fernandes, cujos ensinamentos de cultura celular e biologia molecular foram fundamentais para a conclusão deste mestrado e cuja amizade quero levar para a vida toda. Você é um anjo que Deus colocou no meu caminho!

A todos que me ajudaram para a realização deste trabalho: Prof. Dr. Edison Durigon, Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso, Dra. Danielle de Oliveira Durigon, Dr. Paulo Leite, Dra. Danielle Bastos, Dra. Veridiana Munford, Rafael Rahal, Pedro Ribeiro, Rose, Ronaldo. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados e generosidade ímpar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e a todo o Departamento, pelo acolhimento, auxílio e conhecimento.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas, que foi minha segunda casa pelos últimos dois anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante o Mestrado de 2015 até o presente ano.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less."*

Marie Curie



## RESUMO

OHKI, C.M.Y. **Avaliação da infecção do Zika vírus em astrócitos**. 2019. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O Zika vírus (ZIKV) é um flavivírus capaz de causar infecção em humanos após a contaminação através da picada por mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*, por transmissão sexual ou vertical (da mãe para o feto). Em 2015, a linhagem brasileira deste vírus - ZIKV<sup>BR</sup> - produziu uma epidemia no Brasil, gerando diversos casos de infecção congênita por transmissão vertical, caracterizada por malformações cerebrais. Estudos *in vitro* em células progenitoras neurais, neurônios e organoides derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) revelaram o neurotropismo do ZIKV<sup>BR</sup> e ajudaram a clarificar sua relação com o Sistema Nervoso Central (SNC), mostrando que essas células são preferencialmente afetadas pela infecção. Neste projeto analisamos os efeitos da infecção do ZIKV<sup>BR</sup> em astrócitos, células da glia responsáveis pela homeostase e defesa do SNC. Para tanto, produzimos astrócitos a partir de duas linhagens de iPSC humanas para identificar aspectos moleculares e celulares decorrentes da infecção com o vírus. Os resultados mostraram que os astrócitos são susceptíveis e permissíveis à infecção por ZIKV<sup>BR</sup> e respondem à presença do vírus sofrendo apoptose e produzindo citocinas. Ademais, os astrócitos apresentaram aumento da expressão gênica de receptores TAM, receptores envolvidos com a regulação de resposta imune e também candidatos à entrada viral, e de transportadores de glutamato. Adicionalmente, a captação de glutamato foi prejudicada, bem como a sinaptogênese, quando cultivamos neurônios com astrócitos infectados ou com o sobrenadante de cultura de astrócitos livre de vírus, indicando que os produtos metabólicos gerados por astrócitos infectados afetam o fenótipo neuronal. Por fim, mostramos que mesmo infectadas, NPC se diferenciam em astrócitos. Os resultados gerados neste trabalho auxiliam a compreender os efeitos biológicos causados pelo ZIKV<sup>BR</sup> em astrócitos derivados de iPSC humanas, o que pode contribuir para o melhor entendimento da patogênese do ZIKV no SNC.

Palavras-chave: Zika vírus. Astrócitos. Células-tronco pluripotentes induzidas. Microcefalia. Sistema nervoso central.

## ABSTRACT

OHKI, C.M.Y. **Evaluation of Zika virus infection in astrocytes.** 2019. 84 p. Dissertation (Master thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Zika Virus (ZIKV) is a flavivirus able to promote human infection through bites of *Aedes* female mosquitoes, sexual or vertical transmission (from expectant mothers to fetuses). In 2015, the Brazilian strain of this virus - ZIKV<sup>BR</sup> - caused a significant outbreak in Brazil, which led to numerous cases of congenital infection after vertical transmission. *In vitro* studies with neural progenitor cells (NPC), neurons and brain organoids derived from human induced pluripotent stem cells (iPSC), have reported ZIKV<sup>BR</sup> neurotropism and helped clarify its correlation with the Central Nervous System (CNS) by showing that these cells are significantly affected by infection. In this project, we analyzed the effects of ZIKV<sup>BR</sup> infection in astrocytes, glial cells responsible for CNS homeostasis and defense. In order to do so, we have generated astrocytes from two human iPSC lineages to verify molecular and cellular changes regarding virus infection. Our results have shown that astrocytes are susceptible and permissive to ZIKV<sup>BR</sup> and respond to viral presence by undergoing apoptosis and releasing cytokines. In addition, after infection, astrocytes had increased expression of TAM receptors, which are involved with suppression of immune response and also candidates for viral entry, and glutamate transporters. Additionally, we have also verified impaired glutamate uptake by these astrocytes, as well as synaptogenesis when mature neurons were cultivated in the presence of infected astrocytes or with their virus-free supernatant, indicating that metabolic products of infected astrocytes affected neuronal phenotype. At last, we have demonstrated that generation of astrocytes from infected NPC is possible. This work pursued to understand the biological effects caused by ZIKV<sup>BR</sup> in human iPSC-derived astrocytes, which could provide a better comprehension about ZIKV pathogenesis in CNS.

Keywords: Zika virus. Astrocytes. Induced pluripotent stem cells. Microcephaly. Central nervous system.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
$\mu\text{m}$	micrômetro
AGM	do inglês " <i>Astrocyte Growth Medium</i> " = meio de crescimento de astrócitos
bFGF-2	do inglês " <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> " = fator de crescimento de fibroblasto
BHE	Barreira Hemato-Encefálica
BSA	do inglês " <i>Bovine Serum Albumin</i> " = albumina sérica bovina
$\text{cm}^3$	centímetro cúbico
cDNA	do inglês " <i>Complementary Desoxirribonucleic Acid</i> " = Ácido Desoxirribonucléico complementar
CCL5/RANTES	do inglês " <i>Chemokine (C-C motif) ligand 5 / Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted</i> "
c-Myc	do inglês " <i>Myc proto-oncogene protein</i> " = proteína proto-oncogênica Myc
$\text{CO}_2$	dióxido de carbono
Ct	do inglês " <i>Threshold cycle</i> " = limiar comparativo de ciclos
CXCL10/IP-10	do inglês " <i>C-X-C motif chemokine 10 / Interferon-gamma-induced protein 10</i> " = Proteína 10 induzida por interferon-gama
DAPI	4',6-diamidino-2- phenylindol
DENV	do inglês " <i>Dengue Virus</i> " = Vírus da Dengue
DMEM	do inglês " <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> "
DPBS	do inglês " <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> " = Dulbecco tampão salina-fostato

EAAT	do inglês " <i>Excitatory Amino Acid Transporter</i> " = transportador de aminoácido excitatório
EB	do inglês " <i>Embryonic Bodies</i> " = corpos embrióides
ECP	efeito citopático
GAPDH	do inglês " <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i> " = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFAP	do inglês " <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> " = proteína glial fibrilar ácida
h.p.i.	horas pós-infecção
IL	interleucina
IFN- $\gamma$	interferon-gama
iPSC	do inglês " <i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> " = células-tronco pluripotentes induzidas
Klf-4	do inglês " <i>Kruppel-like factor 4</i> "
JEV	do inglês " <i>Japanese Encephalitis Virus</i> " = Vírus da Encefalite Japonesa
MAP2	do inglês " <i>Microtubule-associated Protein 2</i> " = proteína associada a microtúbulos
mL	mililitro
MOI	do inglês " <i>Multiplicity of Infection</i> " = multiplicidade de infecção
nmol	nanomol
NB	Meio de crescimento neural, contendo os suplementos <u>N2</u> e <u>B27</u>
NBF	Meio de crescimento neural, contendo os suplementos <u>N2</u> e <u>B27</u> e b- <u>EGF-2</u>
ng	nanograma
NPC	do inglês " <i>Neural Progenitor Cells</i> " = células progenitoras neurais
Oct4	do inglês " <i>Octamer 4</i> "
PBS	do inglês " <i>Phosphate Buffered Saline</i> " = tampão salina-fostato

PFU	do inglês " <i>Plaque-forming Unit</i> " = unidade formadora de placa
qPCR	do inglês " <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> " = reação em cadeia da polimerase
rEGF	do inglês " <i>Recombinant Epidermal Growth Factor</i> " = fator de crescimento epidermal recombinante
Ri	do inglês " <i>Rock inhibitor</i> " = inibidor de Rock
RNA	do inglês " <i>Ribonucleic Acid</i> " = Ácido Ribonucléico
rpm	rotações por minuto
S100B	do inglês " <i>S100 Calcium Binding Protein B</i> " = proteína B de ligação ao cálcio S100
SCZ	Síndrome Congênita do Zika Vírus
SFB	Soro Fetal Bovino
SHED	do inglês " <i>Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth</i> " = Células-tronco de dente decíduo esfoliado
SJL	do inglês " <i>Swiss Jim Lambert</i> "
SNC	Sistema Nervoso Central
SOX2	do inglês " <i>SYR (sex determining region Y) – box2</i> "
TAM	grupo de receptores <u>T</u> YRO3, <u>A</u> XL e <u>M</u> ERTK
TBEV	do inglês " <i>Tick-Borne Encephalitis Virus</i> " = Vírus da Encefalite do Carrapato
VEGF	do inglês " <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> " = fator endotelial de crescimento vascular
WNV	do inglês " <i>West Nile Virus</i> " = Vírus do Nilo Ocidental
ZIKV	Zika Vírus
ZIKV <sup>AF</sup>	linhagem africana do Zika Vírus
ZIKV <sup>BR</sup>	linhagem brasileira do Zika Vírus

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 ZIKA VÍRUS .....	20
2.2 O NEUROTROPISMO DO ZIKA VÍRUS.....	22
2.3 CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS COMO FERRAMENTA NA MODELAGEM DE DOENÇAS.....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 PRODUÇÃO DE ASTRÓCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC).....	30
4.2 INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ASTRÓCITOS COM ZIKV <sup>BR</sup> .....	31
4.3 PRODUÇÃO DE ASTRÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS (NPC) INFECTADAS COM ZIKV <sup>BR</sup> .....	32
4.4 ANÁLISE MOLECULAR POR PCR QUANTITATIVO (qPCR) .....	32
4.4.1 <i>Análise de expressão gênica em astrócitos</i> .....	32
4.4.2 <i>Análise da presença de RNA viral em sobrenadantes e células</i> .....	33
4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTÉICA DE ASTRÓCITOS POR ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	34
4.6 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM ASTRÓCITOS.....	35
4.7 ANÁLISE DE GLUTAMATO EM ASTRÓCITOS .....	36

4.8 PRODUÇÃO DE NEURÔNIOS A PARTIR DE NPC .....	36
4.8.1 <i>Cocultura de astrócitos infectados e neurônios</i> .....	36
4.8.2 <i>Cultura de neurônios em meio condicionado de astrócitos infectados com ZIKV<sup>BR</sup></i> .....	37
4.9 CONTAGEM DE SINAPSES COLOCALIZADAS (PUNCTA) .....	37
4.10 ESTATÍSTICA .....	38
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
5.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DA INFECÇÃO VIRAL DE ASTRÓCITOS A PARTIR DE iPSC HUMANAS .....	39
5.1.1 <i>Geração de astrócitos derivados de iPSC</i> .....	39
5.1.2 <i>Infecção de astrócitos por ZIKV<sup>BR</sup></i> .....	43
5.1.3 <i>Análise da expressão gênica de receptores TAM</i> .....	46
5.1.4 <i>Análise de morte celular por expressão protéica de Caspase-3</i> .....	48
5.1.5 <i>Análise da liberação de citocinas por astrócitos</i> .....	51
5.1.6 <i>Análise de glutamato extracelular e da expressão gênica de seus transportadores</i> .....	55
5.1.7 <i>Análise de sinaptogênese em neurônios</i> .....	56
<u>5.1.7.1 <i>Análise de sinaptogênese em neurônios cultivados com sobrenadantes de astrócitos infectados (MOI 1)</i></u> .....	<u>57</u>
<u>5.1.7.2 <i>Análise de sinaptogênese em neurônios cocultivados com astrócitos infectados com ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1)</i></u> .....	<u>58</u>
5.2 ANÁLISE DE ASTRÓCITOS DERIVADOS DE NPC INFECTADAS POR ZIKV <sup>BR</sup> (MOI 1) .....	61
5.2.1 <i>Geração de astrócitos derivados de NPC infectadas</i> .....	61
5.2.2 <i>Presença viral em astrócitos derivados de astroglíogênese infectada</i> .....	65
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>67</b>
6.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DA INFECÇÃO VIRAL DE ASTRÓCITOS A PARTIR DE iPSC HUMANAS .....	67

6.2 ANÁLISE DE ASTRÓCITOS DERIVADOS DE NPC INFECTADAS POR ZIKV <sup>BR</sup> (MOI 1) .....	74
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS* .....</b>	<b>76</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O ZIKV é um vírus da família *Flaviviridae* que recebeu enorme atenção mundial a partir de 2015, quando então surgiram vários casos de recém-nascidos com microcefalia na região Nordeste do Brasil (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE., 2015). Desde seu primeiro isolamento em macacos Rhesus (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952), as infecções em humanos só foram observadas em nível mundial no início do século XXI, com sintomatologia branda como febre, erupções maculopapulares e dores de cabeça e nas articulações (como revisto por PETERSEN et al., 2016). As consequências da infecção pelo ZIKV que estavam sendo observadas nos recém-nascidos, na forma de uma síndrome denominada Síndrome Congênita do Zika (SCZ), com especial comprometimento do SNC (MIRANDA-FILHO et al., 2016), nunca haviam sido descritas anteriormente.

A capacidade de infecção do ZIKV no SNC já havia sido demonstrada experimentalmente, com a injeção direta do vírus em cérebros de camundongos neonatos (BELL; FIELD; NARANG, 1971). Apesar dos vírus terem sido inoculados diretamente no cérebro dos camundongos, as células do SNC se mostraram susceptíveis e permissíveis ao ZIKV, revelando inclusive um efeito citopático (ECP) específico, com o aumento da relação núcleo/citoplasma, com núcleo de aspecto globoso e vazio à observação histológica. Após esse artigo de 1971, em 2016 foi observado semelhante ECP à histologia do cérebro de camundongos neonatos, porém após a transmissão vertical em camundongos prenhes infectados pela linhagem brasileira do ZIKV, comprovando não apenas o tropismo do vírus pelo SNC, mas também sua capacidade de atravessar a placenta (CUGOLA et al., 2016). Apesar do neurotropismo do ZIKV estar postulado e evidenciado, ainda faltam informações acerca dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da infecção no SNC, os quais estão ainda sendo avaliados pela comunidade científica nos diferentes tipos celulares.

Os astrócitos são as células mais abundantes e mais heterogêneas da glia no SNC, promovendo suporte estrutural, metabólico e trófico aos neurônios. Além disso, os astrócitos parecem estar envolvidos em mecanismos neuroprotetores, de neurogênese e de sinaptogênese durante o processo de maturação neuronal (BECERRA-CALIXTO; CARDONA-GÓMEZ, 2017; JOHNSON et al., 2007). Existem

evidências de que astrócitos seriam células susceptíveis e permissíveis ao ZIKV (LANKO et al., 2017a; LIMONTA et al., 2018; SIMONIN et al., 2016; STEFANIK et al., 2018). Além disso, astrócitos também têm alta expressão do receptor AXL (MEERTENS et al., 2017; NOWAKOWSKI et al., 2016), um membro da família de receptores TAM (juntamente com TYRO3 e MERTK), que já foram implicados na entrada de ZIKV e Dengue na célula hospedeira (HAMEL et al., 2015; MEERTENS et al., 2012).

Considerando o exposto, se faz necessário entender e explorar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença congênita causada pelo ZIKV, e a tecnologia utilizada na modelagem de doenças através de produção de tipos celulares específicos do SNC *in vitro* a partir das iPSC têm se mostrado valiosa, tanto para modelar a infecção no SNC causada pelo ZIKV (CUGOLA et al., 2016; TANG et al., 2016), quanto para a produção de tipos celulares de interesse de outras doenças infecciosas, como na infecção pelo vírus da Herpes (D'AIUTO et al., 2019) e da hepatite E (TODT et al., 2018). De maneira mais ampla, o uso de iPSC permitiu a geração de modelos celulares para o estudo de doenças em células-alvo, preservando ainda o *background* genético do paciente, denominando-se esse tipo de abordagem de modelagem de doenças. Esta também fornece a possibilidade de testar medicamentos específicos *in vitro* (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011, 2013). Importante ressaltar que estratégias como essa tem sido largamente utilizadas para estudar doenças neurodegenerativas e do neurodesenvolvimento, justamente pela dificuldade de ter acesso a células do SNC vivas e em funcionamento (EBERT et al., 2009; IMAIZUMI et al., 2012; KONDO et al., 2013; RUSSO et al., 2018; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; YU et al., 2014).

Neste contexto, como mencionado anteriormente, nosso grupo demonstrou que células progenitoras neurais (NPC), neurônios e organóides cerebrais derivados de iPSC são susceptíveis e permissíveis ao ZIKV, cuja infecção gera alterações morfológicas e morte celular significativa (CUGOLA et al., 2016). Entretanto, este trabalho não incluiu a abordagem de astrócitos e possíveis fenótipos que essas células pudessem apresentar frente à infecção pelo ZIKV. Portanto, considerando a importância dos astrócitos para a homeostase e regulação imune no SNC e a dimensão dos prejuízos causados pela infecção pelo ZIKV em termos de saúde

pública, visamos entender os efeitos biológicos que este vírus pode gerar em duas linhagens de astrócitos derivados de iPSC humanas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A seguir, teremos uma breve revisão bibliográfica de trabalhos cujos temas permeiam o conteúdo dessa dissertação.

### 2.1 ZIKA VÍRUS

O Zika Vírus (ZIKV) é um flavivírus envelopado pertencente à família *Flaviviridae* e que possui genoma de RNA fita simples de polaridade positiva de aproximadamente 11 kb, o qual codifica uma poliproteína que é posteriormente clivada por proteases virais e celulares em 3 proteínas estruturais (envelope (E), capsídeo (C) e membrana (M)) e 7 não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (DEVHARE et al., 2017).

O vírus foi isolado pela primeira vez do sangue de macacos Rhesus sentinelas em Uganda (1947), sendo em seguida encontrado em mosquitos *Aedes* na África e na Ásia (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; GARCIA; MARCHETTE; RUDNICK, 1969). O primeiro caso oficialmente relatado de infecção pelo ZIKV em humanos ocorreu no início da década de 60 (SIMPSON, 1964) em Uganda, e apenas mais tarde a primeira epidemia afetou a ilha de Yap, na Micronésia em 2007 (LANCIOTTI et al., 2008). Em 2013, um número significativo de casos de infecção foi reportado e associado a distúrbios neurológicos como a Síndrome de Guillain-Barré (BESNARD et al., 2014; CAO-LORMEAU et al., 2016; HUGHES; REES, 2017). Casos de infecção aguda por ZIKV contaram com encefalite e outros distúrbios neurológicos em adultos (ZUKOR et al., 2018).

Até então, a infecção pelo ZIKV sempre foi associada apenas a uma sintomatologia branda comum, como causada por outros flavivírus, como o vírus da Dengue (DENV), levando a um quadro febril, cefaléia, dores nas articulações e manifestações cutâneas (SHUAIB et al., 2016). Bem caracterizado como um arbovírus (ou seja, transmitido pela picada de artrópodes - os mosquitos-fêmea do gênero *Aedes sp.*), a comunidade científica passou a investigar outras formas de transmissão que foram então confirmadas: a sexual (D'ORTENZIO et al., 2016; MANSUY et al., 2016; TANG et al., 2016b), a via transfusão sanguínea (MOTTA et al., 2016; VASUDEVAN et al., 2018) e a vertical (NGUYEN et al., 2017; WU et al., 2016).

No Brasil, os casos de recém-nascidos com microcefalia estavam sendo associados à transmissão vertical do ZIKV, quadro que nunca havia sido relacionado a outras cepas circulantes e cuja forma de transmissão foi evidenciada durante a epidemia que afetou o Brasil em 2015. Neste ano, o Ministério da Saúde do Brasil declarou os casos de infecção por esse vírus como emergência na saúde pública, no qual foram contabilizados 37.011 casos de infecção aguda pelo ZIKV (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE., 2018a), ao mesmo tempo em que a situação se agravou com o número elevado de mulheres grávidas, infectadas durante a gestação, e que deram à luz crianças microcefálicas (DE OLIVEIRA et al., 2017). Neste cenário, estudos realizados sugeriam que o vírus fosse capaz de ultrapassar a barreira placentária por estar presente no líquido amniótico de algumas mães, no sangue de bebês com microcefalia e em amostras de cérebro fetal pós-interrupção gestacional (MARTINES et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; VENTURA et al., 2016).

Sendo assim, essa associação epidemiológica passou a ser investigada para comprovar a correlação direta entre a infecção viral materna e as malformações congênitas, as quais foram agrupadas na denominada Síndrome Congênita do Zika Vírus (SCZ) (MIRANDA-FILHO et al., 2016). Não somente a microcefalia mas também outras anomalias congênitas foram categorizadas na SCZ, assim como artrogripose, paralisia do diafragma e calcificação cerebral (MENESES et al., 2017). De 2015 a 2018, 2.819 casos de SCZ foram confirmados (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE., 2018b), porém os mecanismos pelos quais o ZIKV consegue invadir e se propagar no SNC de modo a gerar tais fenótipos clínicos ainda estão sendo investigados. Estas manifestações clínicas, até então inéditas na história do ZIKV, despertaram a atenção da comunidade científica, que procurou investigar de que forma o vírus poderia ter evoluído para afetar o SNC. Uma alta similaridade entre as linhagens circulantes nas Américas e a cepa asiática do ZIKV foi encontrada, com algumas mutações (FARIA et al., 2016). Dentre elas, acredita-se que uma mutação de substituição de um resíduo de Serina por uma Asparagina na proteína viral M poderia ser a responsável pelo neurotropismo do ZIKV (YUAN et al., 2017).

Quanto ao diagnóstico, a sorologia ainda é considerada o padrão-ouro para se identificar casos de infecção pelo ZIKV, aliada à detecção de material genético viral em amostras de fluidos biológicos (THEEL; HATA, 2018). Entretanto, a reação cruzada entre anticorpos produzidos em pessoas infectadas por outros flavivírus e as limitações na acurácia de técnicas de biologia molecular na amplificação de RNA viral são obstáculos recorrentes (FISCHER et al., 2018).

Embora grupos de pesquisa estejam em intensa busca por vacinas (ABBINK et al., 2016; DOWD et al., 2016; LAROCCA et al., 2016; SHAN et al., 2017), atualmente ainda não há tratamento ou prevenção para os casos de infecção pelo ZIKV ou para a SCZ. No entanto, algumas drogas aprovadas pela agência federal FDA (*Food and Drug Administration*) têm sido investigadas *in vivo* e *in vitro* por pesquisadores a fim de redirecioná-las para o estudo do bloqueio da transmissão vertical e inibição da replicação viral, como o Sofosbuvir (BULLARD-FEIBELMAN et al., 2017; FERREIRA et al., 2017; MESCI et al., 2018b; SACRAMENTO et al., 2017), a Ribavirina (KAMIYAMA et al., 2017) e a Cloroquina (LI et al., 2017; SHIRYAEV et al., 2017).

## 2.2 O NEUROTROPISMO DO ZIKA VÍRUS

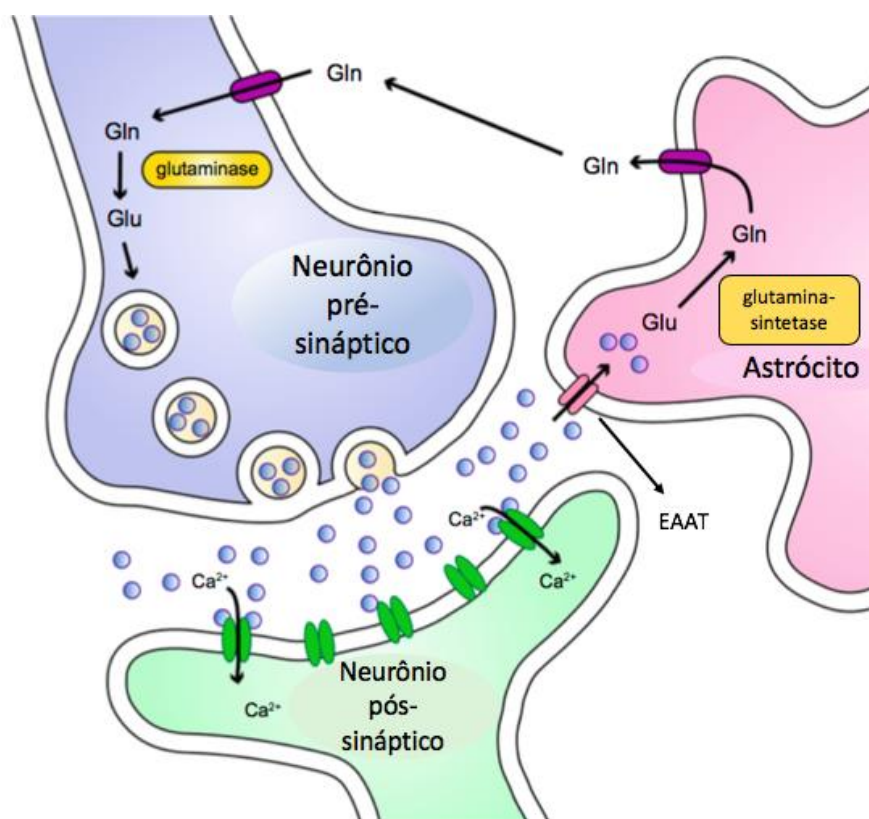
Durante a epidemia de ZIKV no Brasil, muitos trabalhos voltaram-se à finalidade de se comprovar a relação causal que existia entre o vírus e a microcefalia (DANG et al., 2016; GARCEZ et al., 2017; TANG et al., 2016a) e um deles se destacou por demonstrar que a cepa brasileira (ZIKV<sup>BR</sup>) - isolado de um caso febril na região nordeste do Brasil - ultrapassava a barreira placentária, causando malformações congênitas em fetos de camundongos-fêmeas SJL infectadas, prevalecendo em tecidos cerebrais fetais e morte celular abundante nestes. Por outro ângulo, NPC, neurônios e organóides derivados de iPSC de duas linhagens humanas também foram investigados e se mostraram susceptíveis e permissíveis ao ZIKV<sup>BR</sup>, com alterações morfológicas significantes e massivas de morte celular, principalmente em células progenitoras como as NPC (CUGOLA et al., 2016).

A partir da observação de que existe uma predileção do ZIKV a infectar células progenitoras, os pesquisadores passaram a supor que essa seria a causa da depleção celular cerebral e consequente prejuízo de sua proliferação e de neurogênese (DANG

et al., 2016; GABRIEL et al., 2017; SOUZA et al., 2016). Contudo, um estudo aponta a hipótese de que o contrário ocorra na astrogliogênese, que poderia ser favorecida como um mecanismo de defesa celular contra o vírus (LOSSIA et al., 2017).

Os astrócitos são células da glia muito heterogêneas que promovem importante suporte funcional e estrutural para os neurônios no SNC, como revisto recentemente por Verkhratsky e Nedergaard (VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018). Como exemplo da participação de astrócitos na funcionalidade de neurônios, temos a recaptação de glutamato da fenda sináptica, um importante neurotransmissor excitatório do SNC cujo excesso pode levar à excitotoxicidade (CHOI; ROTHMAN, 1990). A reciclagem desse composto se inicia quando este é recaptado por transportadores EAAT presentes na membrana de astrócitos, já que, dentro destas células o glutamato é convertido à glutamina (pela enzima glutamina-sintetase), que então é liberada para o meio extracelular e capturada pelos neurônios, onde é convertido em glutamato e o ciclo recomeça (ANDERSON; SWANSON, 2000), como mostra a figura 1.

**Figura 1** - O ciclo glutamato-glutamina.



Fonte: LENTING et al., 2017 - adaptado por OHKI, C.M.Y. (2019).

Legenda: Transportadores de glutamato (EAAT) na membrana de astrócitos têm a função de recaptar o glutamato excedente da neurotransmissão entre neurônios na fenda sináptica. Dentro do astrócito, o glutamato é convertido em glutamina pela enzima glutamina-sintetase. Por sua vez, a glutamina é transportada ao meio extracelular e então é captada pelos neurônios para posterior conversão em glutamato pela enzima glutaminase. Ca<sup>2+</sup> = íons de cálcio; EAAT = do inglês "Excitatory Amino Acid Transporter"; Glu = Glutamato; Gln = Glutamina.

Além disso, a localização dos astrócitos no microambiente neural facilita a realização de suas funções: estas células são integrantes da unidade neurovascular da Barreira Hemato-Encefálica (BHE), onde se encontram fisicamente ligados às células endoteliais, pericitos e neurônios, permitindo assim a comunicação celular e a mediação de agentes que podem chegar da periferia por meio da corrente sanguínea (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Desta forma, os astrócitos são mediadores na resposta imune inata a patógenos capazes de infiltrar a BHE (RANSOHOFF; BROWN, 2012), secretando citocinas e desencadeando a ativação de proteínas pró-



inflamatórias e moléculas de estresse oxidativo em infecções por flavivírus, como visto inclusive para ZIKV (FARINA; ALOISI; MEINL, 2007; VALADÃO et al., 2016).

No caso do ZIKV, Bell e colaboradores já haviam relatado que astrócitos apresentavam alterações frente à infecção, pela análise histológica de uma hipertrofia significativa de astrócitos hipocámpais murinos frente a uma inoculação cerebral da cepa africana (ZIKV<sup>AF</sup>) (BELL; FIELD; NARANG, 1971). Mais recentemente, outros estudos apontaram a possibilidade do ZIKV infectar massivamente células da glia radial em diferentes espécies (NOWAKOWSKI et al., 2016; WU et al., 2016), o que se confirmou posteriormente: astrócitos fetais primários humanos e murinos se mostraram susceptíveis e permissíveis à infecção pelas linhagens asiática e africana de ZIKV (LANKO et al., 2017b; SIMONIN et al., 2016; VAN DEN POL et al., 2017) e capazes de desencadear respostas imunes inatas poucas horas após a infecção pela liberação de citocinas (HAMEL et al., 2017; STEFANIK et al., 2018). Entretanto, estudos ainda divergem quanto a alguns aspectos. Por exemplo, Lanko e colaboradores infectaram células neurais derivadas de iPSC humanas e notaram que astrócitos são menos susceptíveis às linhagens africana e asiática do ZIKV que NPC e neurônios, ao contrário do que foi descrito em outro estudo que utilizou cultura primária de neurônios e astrócitos de fetos humanos infectados (HUANG et al., 2018; LANKO et al., 2017b).

Também foi visto que o ZIKV pode ser capaz de induzir astrogliose (MUFFAT et al., 2018), alterações no transcriptoma (KOZAK et al., 2017) e resistência à apoptose em astrócitos (LIMONTA et al., 2018). Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos utilizados pelo ZIKV para invadir o SNC e infectar células hospedeiras. A classe de receptores TAM (proteínas tirosina-quinase nomeados a partir de seus três representantes: TYRO3, AXL e MERTK) foram implicados como receptores virais no caso de DENV (MEERTENS et al., 2012) e ZIKV (HAMEL et al., 2015). O receptor AXL, mais especificamente, foi altamente expresso em células da glia radial, microglia, células endoteliais e organoides humanos (MEERTENS et al., 2017; NOWAKOWSKI et al., 2016), levando os pesquisadores a investigar se o AXL seria um possível receptor para ZIKV nesses tipos celulares. Em outros tecidos, a infecção por ZIKV também foi reportada como dependente de receptores TAM (KUMAR et al., 2018; RICHARD et al., 2017), ao mesmo tempo em que alguns estudos discordam sobre o

papel dos receptores TAM como potenciais receptores virais do ZIKV. Nesta última perspectiva, modelos animais *knockout* foram igualmente susceptíveis à infecção (HASTINGS et al., 2017), assim como NPC humanas e organoides cerebrais *AXL*<sup>-/-</sup> (WELLS et al., 2016).

Entretanto, tem se discutido se a participação destes receptores na infecção viral estaria relacionada não somente à entrada viral mas também a um mecanismo de evasão, pois sabe-se que a ligação desses receptores a resíduos de fosfatidilserina expressos na membrana de células apoptóticas e na superfície dos alguns vírus é mediada pelas proteínas Gas6 e Pros1 e desencadeia a cascata de PI3K/AKT, um sinal para mecanismos de fagocitose e sobrevivência celular. Entretanto, quando estão acoplados ao receptor de interferon tipo I (IFNAR), a via JAK/STAT é predominantemente ativada, o que leva à inibição de respostas inflamatórias contra patógenos (LEMKE, 2013). Ainda em relação ao papel dos receptores TAM na resposta imune, já foi reportado que *AXL* estaria associado a um mecanismo de evasão imune por este vírus em astrócitos e não necessariamente à entrada viral, uma vez que seu bloqueio não impedia a infecção mas diminuía a propagação viral (CHEN et al., 2018). Por fim, ainda no caso específico de astrócitos, já foi relatada uma queda significativa da carga viral nestas células ao bloquear *AXL*, revelando que esse receptor tem uma participação no processo de infecção viral (LIMONTA et al., 2018).

Além disso, alguns pesquisadores procuraram avaliar drogas *in vitro* que pudessem bloquear a replicação viral neste tipo celular, como a azitromicina (RETALLACK et al., 2016), 7-deaza-2'-C-metiladenosina (7DMA) (LANKO et al., 2017), niclosamida e PHA-690509 (XU et al., 2016). Nestes estudos, a azitromicina foi capaz de diminuir drasticamente efeitos citopáticos nessas células e a multiplicação viral, assim como a 7DMA., enquanto a niclosamida e a PHA-690509 se mostraram eficientes na inibição da infecção pelo ZIKV.

Deste modo, fica claro que a investigação de astrócitos no contexto da infecção pelo ZIKV vem se expandindo na tentativa de elucidar os mecanismos utilizados pelo vírus para infectar o SNC, considerando a importante função que os astrócitos exercem neste microambiente.

### 2.3 CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS COMO FERRAMENTA NA MODELAGEM DE DOENÇAS

O desenvolvimento da técnica de reprogramação celular (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006) foi um dos grandes avanços da ciência moderna. Por meio da indução da expressão de quatro fatores recombinantes (Sox-2, c-Myc, Oct-4 e Klf-4) em células somáticas, Shinya Yamanaka e sua equipe conseguiram gerar células com alta capacidade de se autorrenovar e se diferenciar em células dos três folhetos germinativos (endoderme, ectoderme e mesoderme) (GURDON, 1962). Assim, a produção de iPSC têm proporcionado à pesquisa básica a análise de sistemas biológicos humanos *in vitro* a nível molecular, driblando as questões éticas do uso de células-tronco embrionárias e demonstrando ser uma alternativa ao uso de animais.

Considerando o fato de que biópsias do SNC para a coleta de amostras para pesquisa não são permitidas e que se faz necessário o estudo minucioso da biologia celular dos diversos tipos celulares deste sistema, o uso de iPSC se mostrou uma tecnologia viável e imprescindível na investigação de condições patológicas neurais, como por exemplo para a Síndrome de Rett (MARCHETTO et al., 2010), autismo (RUSSO et al., 2018) e a doença de Alzheimer (KONDO et al., 2013).

Outra grande vantagem para o uso de iPSC é a manutenção do *background* genético da célula original, motivo pelo qual a geração de células diferenciadas a partir de iPSC tem chamado a atenção da medicina personalizada. Dessa forma, é possível estabelecer o estudo de triagem de drogas de modo paciente-específico (MARCHETTO; WINNER; GAGE, 2010).

Além disso, mais recentemente, essas células têm sido direcionadas à produção de organóides, estruturas tridimensionais multi-celulares que se assemelham, fisiológica e morfológicamente, a órgãos em miniatura (justificando a denominação popular de "mini-órgãos"). No caso do SNC, Lancaster e colaboradores recentemente conseguiram desenvolver organóides cerebrais através de uma tecnologia robusta (LANCASTER; KNOBLICH, 2014), que vem sendo reproduzida para o estudo de doenças genéticas que podem levar à fenótipos como a microcefalia (LANCASTER et al., 2013). Neste mesmo estudo, o grupo de pesquisadores afirma que o processo de geração desses organóides cerebrais relembra o desenvolvimento

embrionário do cérebro humano, em que células progenitoras proliferam, se diferenciam e migram em direção às camadas mais exteriores ao longo do tempo.

Em se tratando da análise dos efeitos biológicos de infecções virais, a versatilidade e facilidade da modelagem de doenças *in vitro* têm crescido, como pode ser visto, por exemplo, na grande variedade de estudos sobre o ZIKV que utilizam iPSC como fonte de células de interesse.

O primeiro estudo que estabeleceu a associação direta entre ZIKV<sup>BR</sup> e a ocorrência da microcefalia demonstrou, além de dados de análises *in vivo*, a infecção dessa linhagem em NPC, neurônios, neuroesferas e organóides cerebrais derivados de iPSC humanas (CUGOLA et al., 2016). Resultados de outros grupos corroboram estes achados, inclusive quando a cepa africana (ZIKV<sup>AF</sup>) era analisada (DANG et al., 2016; GABRIEL et al., 2017; GARCEZ et al., 2017; TANG et al., 2016a).

Dessa forma, a utilização de células especializadas derivadas de iPSC tem contribuindo para o estudo do ZIKV para além das análises *in vivo*, auxiliando também na investigação de mecanismos quanto para a triagem de drogas que possam limitar a infecção viral especialmente em células humanas (MESCI et al., 2018b; RETALLACK et al., 2016; WATANABE et al., 2017).

### 3 OBJETIVOS

A descrição do objetivo geral deste projeto encontra-se abaixo, seguida dos objetivos específicos.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este projeto teve como principal objetivo analisar os efeitos biológicos da infecção pela linhagem brasileira do Zika vírus (ZIKV<sup>BR</sup>) em cultura celular de astrócitos humanos, observando aspectos celulares, fisiológicos e moleculares, que podem auxiliar na construção de informações acerca dos mecanismos usados pelo vírus para causar patogenicidade no SNC. Apesar de não ser um objetivo do presente projeto, a elucidação de vias utilizadas pelo vírus em seu processo de infecção/patogênese podem auxiliar na identificação de alvos terapêuticos que venham a contribuir para combater os efeitos deletérios do vírus no sistema nervoso. Além disso, os mecanismos evidenciados neste trabalho, podem também servir como base para elucidar a fisiopatologia de outras infecções no SNC.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a morfologia dos astrócitos após a infecção por ZIKV e possíveis efeitos citopáticos virais;
- Verificar o perfil de expressão de citocinas após a infecção por ZIKV;
- Analisar o perfil de expressão gênica e proteica em astrócitos após a infecção por ZIKV;
- Analisar alterações funcionais em astrócitos infectados por ZIKV; bem como na sinaptogênese de neurônios cocultivados com astrócitos infectados ou com meio condicionado de astrócitos, contendo seus produtos metabólicos;
- Investigar a viabilidade da produção de astrócitos a partir de NPC infectadas por ZIKV.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir, temos descrita a metodologia realizada neste projeto, desde a geração de astrócitos até a análise de sinaptogênese em neurônios. Estes experimentos foram realizados utilizando a cepa brasileira do Zika vírus (ZIKV<sup>BR</sup>), o qual foi isolado de um caso clínico no Brasil pelo grupo do Professor Dr. Pedro Vasconcelos, do Instituto Evandro Chagas em Belém-PA. Os ensaios de cultura e titulação viral ( $4 \times 10^{12}$  PFU/mL) foram realizadas em colaboração com o grupo de pesquisa do laboratório do Prof. Dr. Edison Durigon do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e os ensaios realizados à luz do trabalho anteriormente feito pelo nosso grupo (CUGOLA et al., 2016).

### 4.1 PRODUÇÃO DE ASTRÓCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSC)

A fim de obter astrócitos viáveis para este estudo, foram cultivadas iPSC derivadas das células de polpa de dente decíduo esfoliado (SHED) de 2 pacientes, sem qualquer transtorno neurológico (2 meninos com faixa etária entre 5 e 11 anos), denominados neste estudo de L1 e L2 (RUSSO et al., 2018). Estas SHED pertencem a um biorrepositório, aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e sob o número de protocolo 1001 (Biorrepositório: CAAE 58219416.0.0000.5467). Este projeto em específico se encontra submetido e aprovado pelo mesmo comitê (CAAE 69938317.7.0000.5467).

A produção de astrócitos também seguiu protocolo descrito em RUSSO et al., 2018. Brevemente, no quinto dia, as colônias de iPSC tiveram seu meio trocado por meio N2 (DMEM/F12 suplementado com N2 1x (Invitrogen) contendo 1  $\mu$ M de dorsomorfina (Tocris, Ellisville, MO, USA) e 10  $\mu$ M de SB431542 (Stemgent, Massachusetts, USA) e após 48 horas, as colônias foram cultivadas em suspensão como EB (do inglês "*Embryoid Bodies*") por 5 dias em rotação constante de 90 rpm em meio N2. Para obtenção das rosetas, os EB foram coletados em uma placa contendo Matrigel e meio NBF (DMEM/F12 (Life Technologies) suplementado com 0,5x N2 (Life Technologies), 0,5x B-27 (Life Technologies), 20 ng/mL de bFGF-2 (Life

Technologies) e 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich). As rosetas se formaram cerca de 48 horas após a adesão dos EB e foram monitoradas diariamente para avaliar o momento adequado da coleta das células progenitoras neurais (NPC), que crescem no interior das rosetas. As NPC foram coletadas manualmente utilizando o microscópio EVOS (Life Technologies), dissociadas suavemente e plaqueadas em placas revestidas com 10 µg/mL de poliornitina (Sigma-Aldrich) e 2,5 µg/mL de laminina (Life Technologies) para plástico ou 1 µg/mL mais 5 µg/mL, respectivamente das mesmas matrizes, para o vidro, mantidas em meio de cultura NBF.

Para produção de astrócitos, as NPC foram cultivadas na forma de neuroesferas, mantidas em agitação constante (90 rpm) e após uma semana em meio NB sem FGF, foi adicionado o meio de crescimento de astrócitos AGM (do inglês "*Astrocyte Growth Medium*") suplementado com 0,1% de ácido ascórbico, 0,1% de rEGF, 0,2% de insulina, 2.8% de SFB, 0,95% de L-glutamina (Lonza Clonetics®, New Jersey, USA) e 0,95% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) por duas semanas, ainda sob agitação constante a 90 rpm. Após 3 semanas, as neuroesferas foram plaqueadas em placas com revestimento de poliornitina e laminina, e os astrócitos que começaram a se desprender foram posteriormente dissociados utilizando Accutase (Corning®cellgro®, Virginia, USA). Os astrócitos utilizados neste trabalho foram caracterizados e utilizados entre as passagens 2 a 4.

#### 4.2 INFECÇÃO *IN VITRO* DE ASTRÓCITOS COM ZIKV<sup>BR</sup>

Astrócitos derivados de iPSC humanas foram infectadas com ZIKV<sup>BR</sup> e com o meio sobrenadante de cultura de células C6/36 não-infectadas na condição controle (MOCK). As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e após 24 horas, o material viral foi diluído para a obtenção da multiplicidade de infecção (MOI) desejada (MOI 1 e 10).

Para a adsorção viral, as células em monocamada foram incubadas por 1 hora à 4°C com suave agitação a cada 10 minutos. Após esta etapa, o inóculo foi removido e as células lavadas uma vez com PBS 1X (Sigma-Aldrich). Meio de cultura foi adicionado em cada poço, e as células mantidas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> pelo tempo necessário à realização dos experimentos de 48 e 96 horas pós-infecção (h.p.i.). Para

o controle (MOCK), o mesmo volume de sobrenadante foi adicionado a cada experimento, e os mesmos procedimentos foram seguidos.

#### 4.3 PRODUÇÃO DE ASTRÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS (NPC) INFECTADAS COM ZIKV<sup>BR</sup>

Para analisar os efeitos durante os processos de diferenciação neural e produção de astrócitos decorrentes de uma infecção por ZIKV<sup>BR</sup>, as NPC foram infectadas com MOI 1 para posterior diferenciação *in vitro* em astrócitos, seguindo os mesmos protocolos de adsorção viral e diferenciação celular descritos previamente.

#### 4.4 ANÁLISE MOLECULAR POR PCR QUANTITATIVO (qPCR)

O método de qPCR foi utilizado para a averiguação da expressão de certos genes em astrócitos e para a presença viral em células e sobrenadantes.

##### 4.4.1 Análise de expressão gênica em astrócitos

O RNA de cada amostra celular foi extraído usando 1 mL do reagente TRIzol (Invitrogen). Todos os pellets de RNA foram ressuspensos em 30 µL de água destilada livre de RNase, usando o espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies) e estocados a -80°C. O DNA complementar das células (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA obtido, usando o kit "Superscript III Reverse-Transcription" (Invitrogen). As reações de qPCR foram preparadas utilizando o kit "iQ™ SYBR® Green Supermix" (Bio-Rad) e realizadas nas seguintes condições: ativação da polimerase e desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação (a 95°C por 15 segundos) e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto.

Os astrócitos obtidos a partir das iPSC foram analisados a nível molecular por PCR em tempo real (qPCR) com base em genes específicos de receptores TAM (TYRO3, AXL e MERTK) e transportadores de glutamato (EAAT1 e EAAT2). Todas as análises foram feitas usando o gene *housekeeping* de controle de expressão, GAPDH.



As seqüências de oligonucleotídeos utilizadas neste projeto estão descritas na tabela 1.

**Tabela 1:** Sequência de *primers* usados nas reações de PCR quantitativo.

Gene	Sense	Anti-sense
GAPDH	5'TGCACCACCAACTGCTTAGC3'	5'ATGGACTGTGGTCATGAG3'
EAAT1	5'GTCAAAGACGCTGAGTGGGA3'	5' GGTTACTGCACCACAGCCTA3'
EAAT2	5'CGGTTAAAGGAGTTGCCCGA31	5'CTTTCCCGCGGGTACAGATA3'
AXL	5'TGGAGGAGCCCGAAGACAGGAC T3'	5'GAGAGGCCGGGGTGAATGGA G3'
TYRO3	5'CCATATGCTGGCATCGAAAAC3'	5'ATCCCTGCCAGGTAGCTCCA3'
MERTK	5'GATTGGAGACAGGACCAAAGC3'	5'GACGTAAATAACGTCTGCTTG G3'

#### 4.4.2 Análise da presença de RNA viral em sobrenadantes e células

A extração de RNA a partir do material biológico (células ou sobrenadantes) foi realizada como descrito no item anterior. O conjunto de *primers* específicos para ZIKV (ZIKV 835, ZIKV 911c-FAM; previamente descritos em LANCIOTTI et al., 2008) foram sintetizados pela Sigma Life Science, usando 5-FAM como fluorocromo repórter. A reação em tempo real foi feita com 10 µL de cada amostra e 10 µL dos reagentes AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Applied Biosystems). A amplificação foi realizada em um sistema de PCR real time (Applied Biosystems 7500), utilizando os seguintes parâmetros: 45 °C por 15 minutos, 95°C por 15 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação a 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, e 72°C por 30 segundos. Os dados foram analisados em tempo real usando o SDS software (Applied Biosystems).

Para a confirmação dos resultados de sinaptogênese, um ensaio de infectividade viral em células Vero foi feito com o sobrenadante centrifugado de astrócitos (supostamente livre de vírus) , em colaboração com a Dra. Danielle Bastos Araújo, do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas (USP). Nesse ensaio, 700 µL de amostras foram inoculadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm<sup>3</sup> com tapete celular confluyente (~90%) de células VERO-E6 linhagem CCL-81. Após 1 hora de adsorção em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> as

garrafas foram completadas com 4 mL de meio para cultivo celular DMEM (Dulbecco MEM Alta glicose, Vitrocel®) com 2% de soro fetal bovino (Vitrocel®) e 1% de solução de antibiótico e antifúngico (Hyclone®).

As garrafas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e a cada 48 horas a integridade do tapete celular foi observada em microscópio óptico. Após 7 dias o tapete celular infectado foi coletado e submetido a PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR) para determinação de crescimento viral.

O RNA viral foi extraído em extrator automático NucliSENS® easyMag® (BioMerieux, Lyon, France) e submetido ao protocolo de qPCR de acordo com protocolo previamente descrito. Resumidamente, 5 µL do RNA extraído foi adicionado 1 µL de uma mistura de *primers* e sonda (10 pM/1 µL cada) e 19 µL da solução da reação utilizando o kit AgPath-ID One-Step RT-PCR (Applied Biosystems Inc., EUA) conforme instruções do fabricante.

De forma geral, para a detecção e quantificação do RNA viral, foram feitos cálculos de  $2^{-\Delta Ct}$  a partir dos valores de Ct (sigla para "*threshold cycle*") das amostras infectadas por ZIKV<sup>BR</sup> normalizado com MOCK, que então foram transformados em log de base 10 para a verificação da presença do vírus em cultura. Todas as análises foram feitas por quantificação absoluta em duplicatas, relativa ao gene de controle interno usando curvas padrão. Em seguida, os dados foram comparados e analisados no GraphPad Prisma 6 (GraphPad, CA, USA).

#### 4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTÉICA DE ASTRÓCITOS POR ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para análise pós-infecção viral, os astrócitos foram cultivados em placas de 24 poços sobre lamínula de vidro pelos períodos de análise desejados: 48 e 96 h.p.i.. As células foram lavadas com dPBS e fixadas em 4% de paraformaldeído (USB Corporation) durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas 3 vezes com dPBS e permeabilizadas com 0,1% de Triton (Promega) por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram submetidas ao bloqueio em dPBS contendo 2% de soro albumina bovino durante 4 horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas com anticorpos primários por 16 horas a 4°C. Passado o período de incubação dos anticorpos

primários, as células foram lavadas por três vezes com dPBS e os respectivos anticorpos secundários, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 e Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher) foram adicionados e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. Ao final, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e DAPI (1 µg/mL) foi adicionado por 5 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas utilizando ProLong Gold (Thermo Fisher). A imunoreatividade em astrócitos foi avaliada em microscopia de epifluorescência Eclipse 80i e no programa "*NIS Elements version 3.22 Nikon*" (Nikon, TYO, Japão), enquanto para iPSC e NPC foi utilizado o microscópio EVOS e para neurônios, o microscópio confocal Leica. Os anticorpos utilizados neste projeto estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** Anticorpos utilizados para caracterização de astrócitos nos ensaios de imunofluorescência.

<b>Antígeno</b>	<b>Empresa fabricante</b>	<b>Diluição</b>
Flavivírus	Millipore	1:200
Caspase-3 clivada (CASP3)	Cell Signaling	1:400
GFAP	Abcam	1:1000
S100B	Novus Bio	1:500

#### 4.6 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM ASTRÓCITOS

Os astrócitos infectados foram plaqueados e seus sobrenadantes coletados em, no mínimo, triplicatas após 48 e 96 h.p.i., e analisados por técnica de Luminex xMAP magnética. Os níveis de citocina foram normalizados pelo número de células e apresentados quanto sua produção por unidade celular. Esta etapa foi realizada em colaboração com o Dr. Paulo Emílio Corrêa Leite, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Neste ensaio, os seguintes analitos foram verificados em sobrenadantes de astrócitos: IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, eotaxina, bFGF, GCSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , CXCL10/IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, CCL5/RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF. O controle positivo utilizado foi TNF- $\alpha$  na concentração de 20 ng/mL. O experimento foi realizado de acordo com recomendações do fabricante. Em suma, após a calibração e validação do equipamento Bio-Plex Magpix (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA), reconstituição de reagentes e preparação de uma curva-padrão, *beads* magnéticos

foram adicionados a cada poço da placa usada para o ensaio, seguidas dos sobrenadantes, amostras-padrão e controles. A placa foi mantida no escuro por 1 hora em rotação de 350 rpm. Cada etapa foi precedida de lavagem por meio do equipamento automatizado Bio-Plex Pro (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). As amostras foram incubadas com anticorpos, usando os mesmos parâmetros de incubação. Estreptavidina-PE foi adicionado e incubado no escuro por 39 minutos a 350 rpm. Por fim, os *beads* foram ressuspensos em uma solução buffer, agitados a 1200 rpm por 30 segundos e analisados no equipamento Bio-Plex Magpix.

#### 4.7 ANÁLISE DE GLUTAMATO EM ASTRÓCITOS

O sistema de captação do glutamato em astrócitos foi analisado pela utilização do kit da Abnova (Abnova, Taipei City, Taiwan).

Os sobrenadantes de cultura de astrócitos infectados em placas de 24 poços foram coletados em 48 h.p.i. e 96 h.p.i. e submetidos ao protocolo de ensaio colorimétrico, conforme instruções do fabricante.

#### 4.8 PRODUÇÃO DE NEURÔNIOS A PARTIR DE NPC

As NPCs foram cultivadas como descrito nos itens acima em placas de 100 mm de diâmetro. Ao atingirem aproximadamente 80% de confluência, o meio NBF foi substituído por NB contendo 10  $\mu$ M de inibidor da via de ROCK (Y-27632, Calbiochem). As células foram mantidas nesse meio por 48 horas e então, o meio foi novamente substituído por somente meio NB. Essa condição foi mantida por 28 dias com trocas periódicas do meio, período considerado suficiente para a diferenciação neuronal (MARCHETTO et al., 2010).

##### 4.8.1 Cocultura de astrócitos infectados e neurônios

Os astrócitos de uma das linhagens estudadas (L2) foram plaqueados em poços em placas de 24 poços e quando atingiram 100% de confluência, foram infectados com ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1). Após 48 horas de infecção, neurônios (produzidos como descrito acima) foram plaqueados sobre eles de forma paciente-específica,

evitando ativação por antígeno histocompatibilidade. A cocultura foi mantida por uma semana até fixação das células para imunofluorescência.

#### 4.8.2 Cultura de neurônios em meio condicionado de astrócitos infectados com ZIKV<sup>BR</sup>

As NPC da linhagem L2 foram cultivadas como descrito no item 4.1 em poços de placas de 24 poços e, quando atingiram cerca de 80% de confluência, foram destinados ao processo de diferenciação neuronal (descrito no item 3.8). Os neurônios então foram cultivados com meio condicionado de astrócitos infectados de 48 h.p.i., o qual foi previamente ultracentrifugado para eliminação de possíveis partículas virais no sobrenadante (a 19800 rpm por 1 hora a 4°C em rotor SW28).

Para verificar se o meio condicionado de astrócitos estava livre de vírus após este processo, este meio foi aplicado em células Vero, que foram mantidas em 7 dias em cultura. Após este período, seu sobrenadante foi coletado e um qPCR para detecção de RNA viral foi realizado como descrito no item 4.4. Esta etapa foi realizada em colaboração com a Dra. Danielle Bastos Araújo, do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas (USP).

Por fim, os neurônios permaneceram em cultura por uma semana, sendo o meio trocado uma vez durante esse período.

#### 4.9 CONTAGEM DE SINAPSES COLOCALIZADAS (PUNCTA)

Os neurônios cultivados nas duas situações citadas anteriormente foram analisados quanto à sinaptogênese por imunofluorescência. Ou seja, neste ensaio foi verificada a expressão de Homer-1 (uma proteína pre-sináptica) e Sinapsina-1 (pós-sináptica), em seus filamentos MAP-2 positivos. As colocalizações de Homer-1 e Sinapsina-1 em neurônios das condições ZIKV e MOCK foram quantificadas manualmente com o auxílio do *software* ImageJ.

Os anticorpos utilizados estão listadas na tabela 3.

**Tabela 3:** Anticorpos utilizados para análise de sinaptogênese nos ensaios de imunofluorescência.

<b>Antígeno</b>	<b>Empresa fabricante</b>	<b>Diluição</b>
MAP2	Abcam	1:1000
Homer-1	Synaptic Systems	1:200
Sinapsina-1	Millipore	1:500

#### 4.10 ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram empregadas e os gráficos plotados com o auxílio do *software* GraphPad Prisma 6.

## 5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho encontram-se descritos a seguir e são divididos em dois itens, segundo duas diferentes condições experimentais:

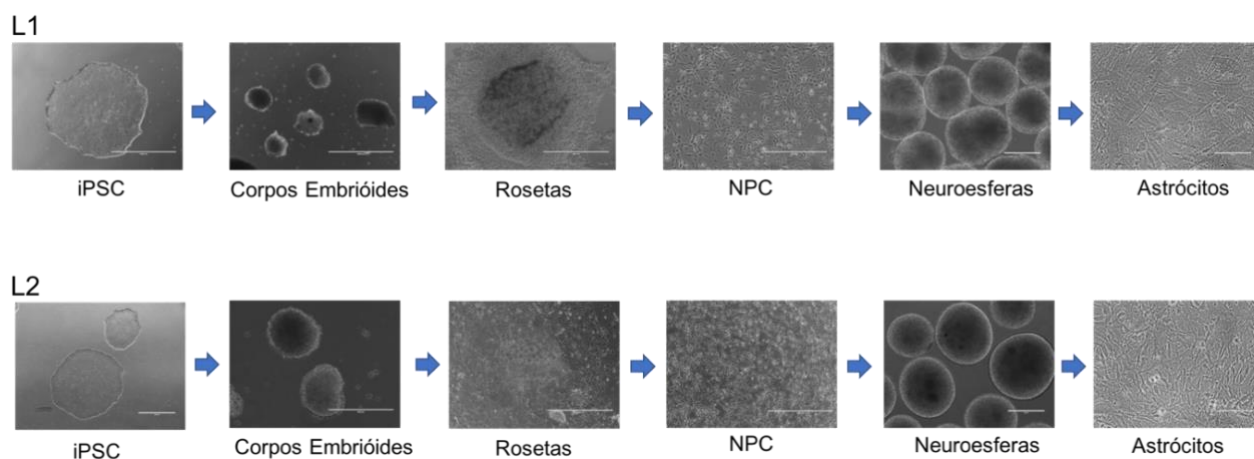
### 5.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DA INFECÇÃO VIRAL DE ASTRÓCITOS A PARTIR DE iPSC HUMANAS

Os astrócitos foram produzidos a partir de NPC derivadas de iPSC humanas, as quais foram previamente geradas pela Dra. Fabiele Russo (RUSSO et al., 2018).

#### 5.1.1 Geração de astrócitos derivados de iPSC

Todas as etapas para a produção de astrócitos a partir de iPSC, para ambas as linhagens celulares estudadas neste projeto (L1 e L2), estão exemplificadas e esquematizadas na figura 2.

**Figura 2** - Geração de astrócitos a partir de iPSC humanas.



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Exemplificação das estruturas e células geradas nas etapas intermediárias durante o processo de astrogliogênese *in vitro*: os corpos embríoides, rosetas, células progenitoras neurais (NPC) e neuroesferas, para as duas linhagens estudadas. Imagens obtidas por microscopia de luz (Barras de escala: iPSC, corpos embríoides e rosetas 1000  $\mu\text{m}$ ; NPC 400  $\mu\text{m}$ ; Neuroesferas 200  $\mu\text{m}$ ; Astrócitos 100  $\mu\text{m}$ . Magnificação: iPSC e corpos embríoides 4x; Rosetas 10x; NPC 10x; Neuroesferas 20x; Astrócitos 40x).

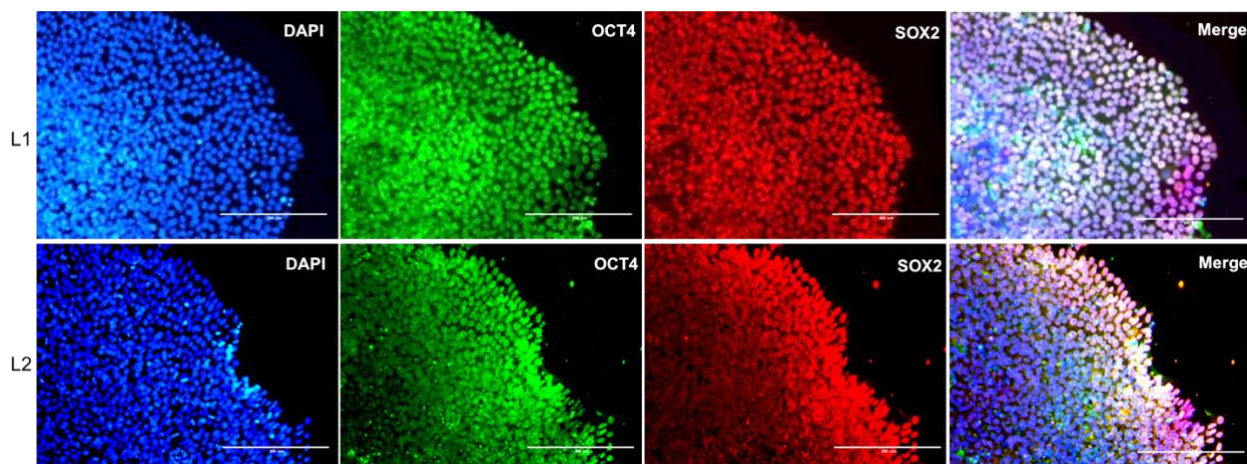
A fim de caracterizar fenotipicamente as iPSC como células pluripotentes, foi realizada a análise de expressão de proteínas relacionadas à manutenção de pluripotência (SOX2 e OCT4) pela técnica de imunofluorescência (Figura 3).

Da mesma forma, as NPC também foram submetidas a este ensaio para verificar a expressão de marcadores característicos neste tipo celular, como Musashi-1 e Nestina (Figura 4). De acordo com os resultados obtidos, as NPC foram produzidas com sucesso, sendo boas fontes para a produção dos modelos celulares neurais a serem utilizados neste projeto.

Após a caracterização e amplificação das NPC, passamos a cultivá-las em suspensão, na forma de neuroesferas, por um mês de modo a direcioná-las à diferenciação em astrócitos. Ao final deste processo, as neuroesferas foram submetidas a adesão em placas tratadas com poliornitina e laminina para que pudéssemos gerar astrócitos (GFAP-positivos, do inglês "*Glial Fibrillary Acidic Protein*", a qual participa do citoesqueleto celular como filamento intermediário marcador de astrócitos), os quais migram a partir das neuroesferas aderidas, o que estabelece o que chamaremos de passagem zero (P0), como mostra a figura 5A. Após dois repiques celulares, estas células foram analisadas quanto a expressão protéica de GFAP novamente e de S100B ("*S100 Calcium Binding Protein B*", uma proteína que encontra-se envolvida no ciclo celular e que também é marcadora comum de astrócitos) (Figura 5B).



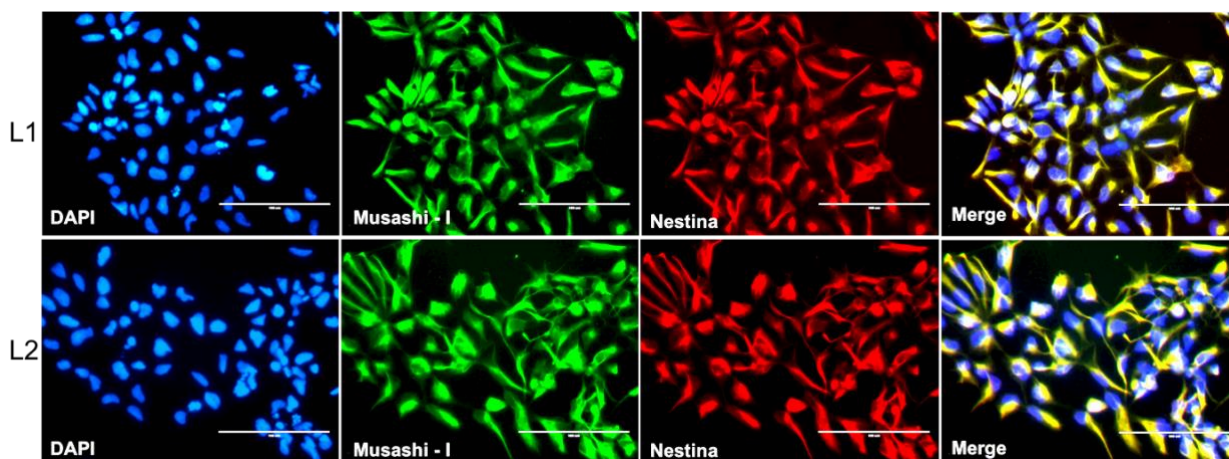
**Figura 3** - Caracterização biológica de iPSC como células pluripotentes por imunofluorescência.



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

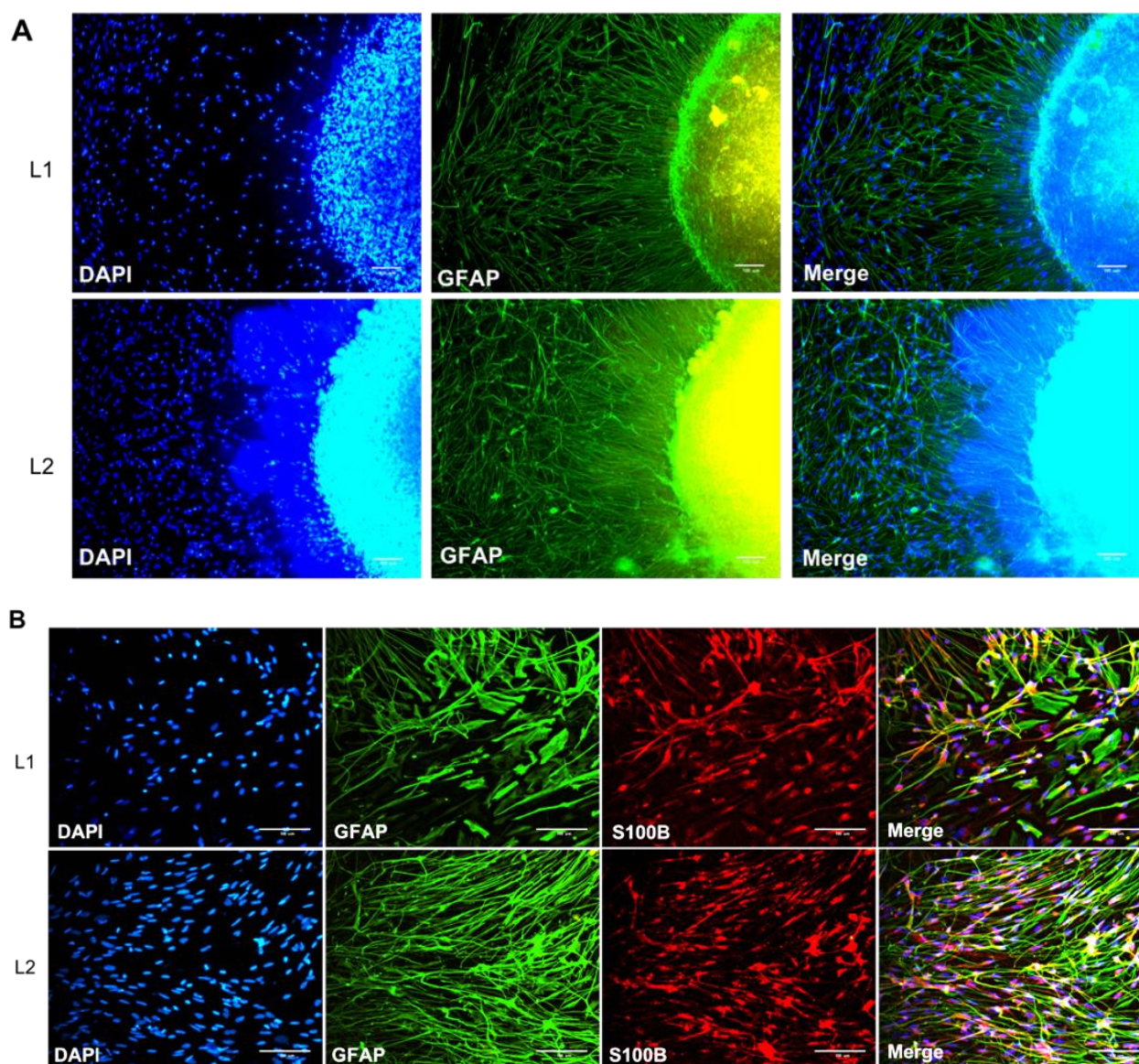
Legenda: iPSC das linhagens L1 e L2 utilizadas neste trabalho, expressando concomitantemente duas proteínas características de pluripotência: OCT4 e SOX2. (Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ . Magnificação: 20x).

**Figura 4**: Caracterização biológica de NPC como progenitoras neurais por imunofluorescência.



Legenda: NPC de L1 e L2 configuram-se como progenitoras viáveis para posterior diferenciação em astrócitos, segundo à expressão protéica de marcadores comuns de células progenitoras neurais, Musashi-I e Nestina. (Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . Magnificação: 40x).

**Figura 5 - Produção de astrócitos e sua caracterização quanto à expressão de GFAP e S100B.**



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

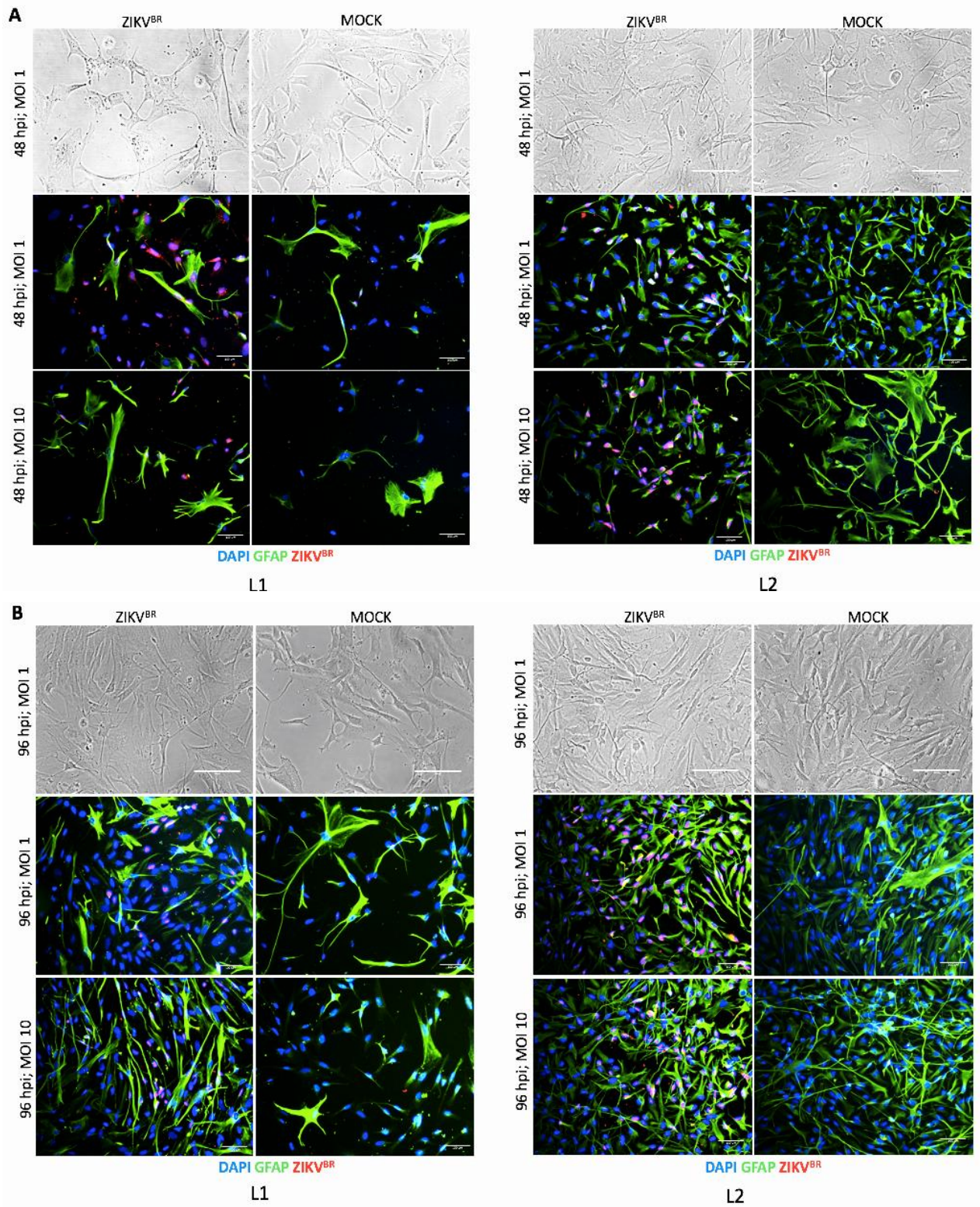
Legenda: Em A) Migração de astrócitos GFAP-positivos, de passagem 0, das linhagens L1 e L2 a partir de neuroesferas aderentes em placas tratadas com poliornitina e laminina. Barra de escala: 100  $\mu$ m. Magnificação: 10x. B) Astrócitos em segunda passagem (P2), expressando GFAP e S100B. (Barra de escala: 100  $\mu$ m. Magnificação: 20x).

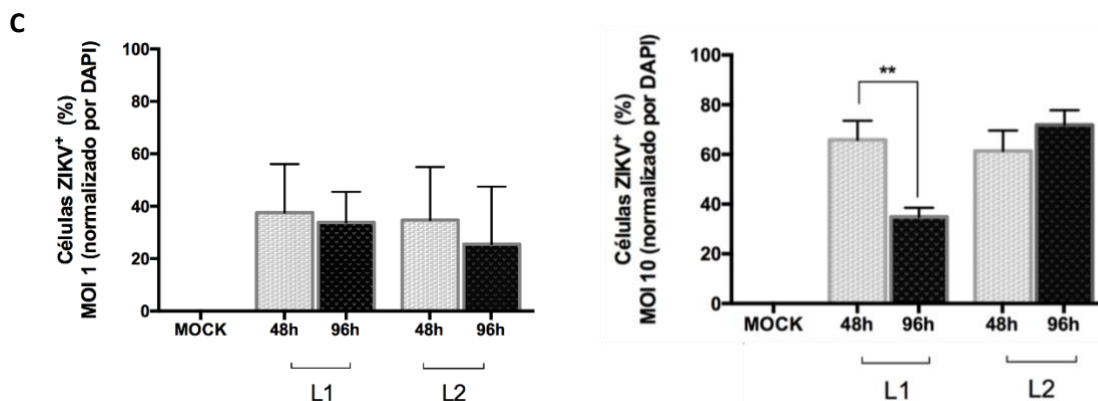
### 5.1.2 Infecção de astrócitos por ZIKV<sup>BR</sup>

Em seguida, os astrócitos foram submetidos à infecção por ZIKV<sup>BR</sup> MOI 1 e 10. Nas figuras 6A e B, visualizamos a marcação de astrócitos com proteína de flavivírus (ZIKV<sup>BR</sup>) nos tempos experimentais de 48 e 96 h.p.i., em ambas as linhagens. A posterior quantificação do número de células ZIKV-positivas em 48 h.p.i. mostra que ambas são susceptíveis ao vírus em MOI 1. Já em MOI 10, há uma diminuição significativa de astrócitos L1 infectados de 48 para 96 h.p.i. (Figura 6C).



**Figura 6** - Presença de proteínas de flavivírus no interior de astrócitos GFAP-positivos infectados com ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1 e 10).





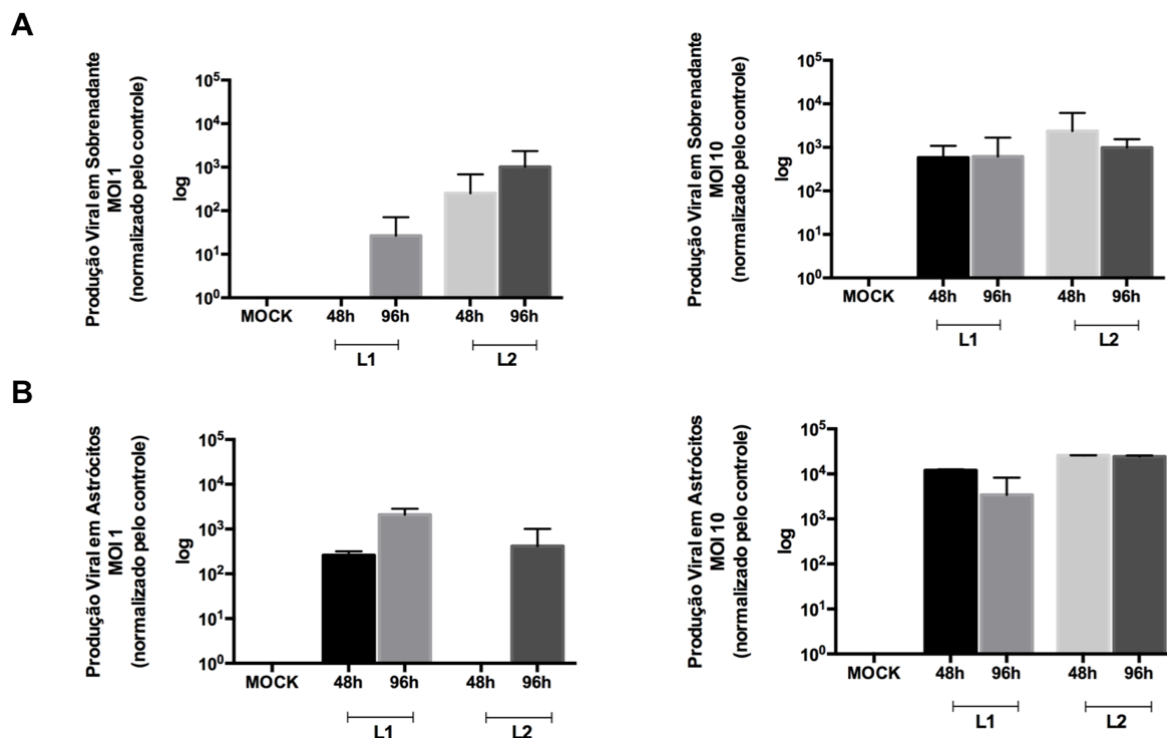
Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Após A) 48 horas e B) 96 horas de infecção nota-se, por imunofluorescência, a presença de proteínas virais no interior dos astrócitos em ambos os MOI estudados (Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . Magnificação: 20x). A figura mostra também imagens dos astrócitos nestes tempos experimentais em MOI 1 vistos por microscopia de contraste de fase (Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . Magnificação: 40x). C) Quantificação de células ZIKV-positivas a partir das imagens de imunofluorescência, demonstrada em porcentagem. Observamos que ambas as linhagens são susceptíveis ao vírus em MOI 1, mas apenas em L1 vemos um decréscimo de células ZIKV-positivas de 48 para 96 h.p.i. em MOI 10 (teste t não-pareado,  $***p=0,0036$ ). A quantidade de células infectadas foi normalizada pelo número total de núcleos (corados por DAPI). Para MOI 1, foram realizados dois experimentos independentes com análise de 15 campos fotográficos de duas linhagens celulares distintas e para MOI 10, um único experimento foi realizado em que foram analisados no mínimo 5 campos. ZB1 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 1. ZB10 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 10.

A presença do ZIKV<sup>BR</sup> também foi investigada no sobrenadante 48 e 96 h.p.i. nos dois MOI testados (Figura 7). É possível observar que a quantidade de RNA viral em sobrenadante aumenta de 48 para 96 h.p.i., apesar de não ter sido detectado RNA viral no meio de cultura L1 no tempo de 48 h.p.i. para a condição MOI 1. Entretanto, neste mesmo ensaio houve a detecção de RNA viral no interior das células. A resposta oposta é observada em L2 (Figura 7B).

Na segunda condição experimental, usando MOI 10, foi possível detectar RNA viral intracelular e no meio extracelular (sobrenadante) nas culturas de ambas as linhagens nos dois tempos experimentais. Com base nestes resultados, observamos que os astrócitos produzidos a partir de iPSC são susceptíveis e permissíveis ao ZIKV<sup>BR</sup>.

**Figura 7:** Produção viral em sobrenadantes e em astrócitos infectados (MOI 1 e 10).



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Em A e B, observamos a produção viral nos tempos experimentais de 48 e 96 h.p.i. em sobrenadantes e em astrócitos pós-infecção, respectivamente. Esta foi medida por log de base 10 nos MOI 1 e 10. Os dados foram normalizados pelo controle (MOCK) nos cálculos de  $2^{-\Delta Ct}$  (nenhuma análise estatística empregada). Foi realizado um único experimento de qPCR com análise de amostras de RNA em duplicata das duas linhagens celulares distintas abordadas neste estudo.

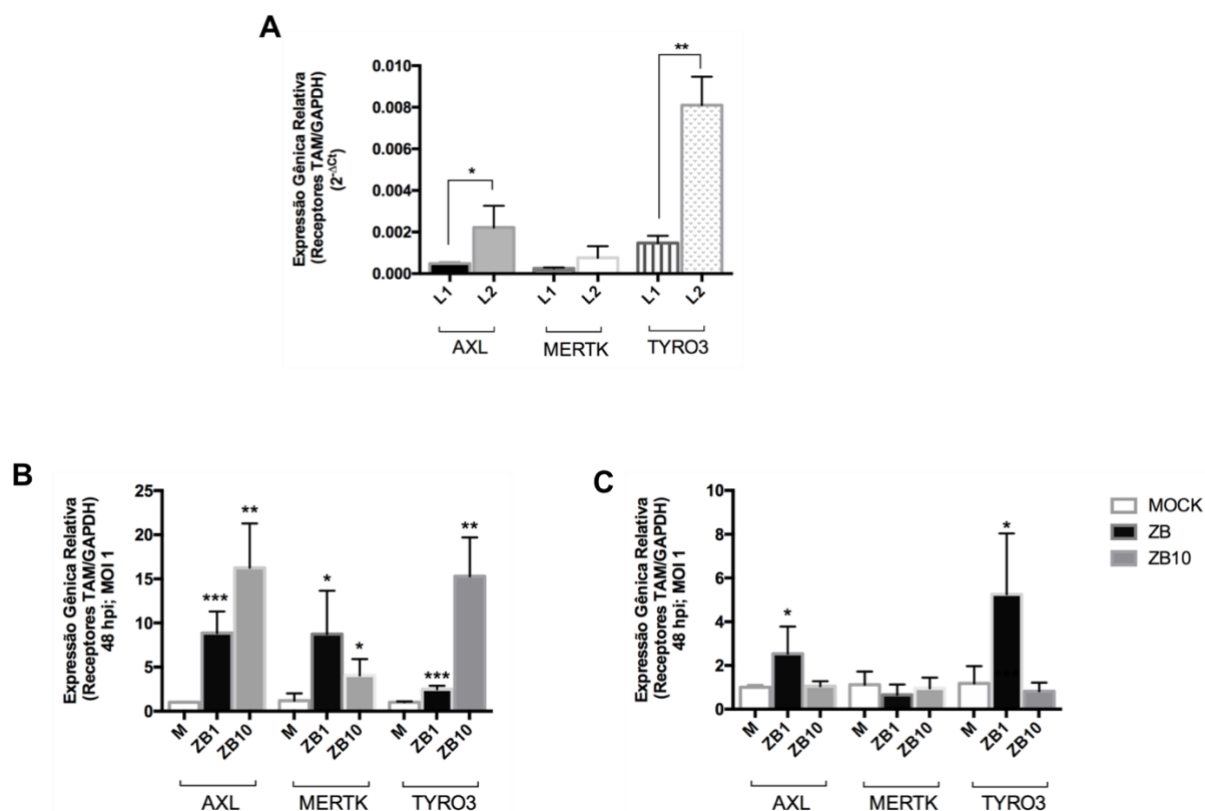
### 5.1.3 Análise da expressão gênica de receptores TAM

Decidimos também, investigar se a infecção poderia desregular a expressão de receptores TAM após 48 h.p.i., implicados na entrada viral e na evasão de resposta imune pelo vírus. Antes da infecção, nota-se que, em comparação a L1, os receptores AXL e TYRO3 encontram-se mais expressos em L2 em um contexto fisiológico, *i.e.*, livre de infecção. Essa mesma tendência é vista para MERTK, mas não de forma significativa (Figura 8A).

Todavia, quando os astrócitos são submetidos à infecção por ZIKV<sup>BR</sup>, todos os receptores TAM têm sua expressão aumentada em astrócitos L1 infectados (em relação a MOCK) em 48 h.p.i. (MOI 1 e 10), enquanto isso só acontece com AXL e TYRO3 em L2, em MOI 1 (Figuras 8B e C). Portanto, a infecção com ZIKV<sup>BR</sup> parece

desregular a expressão de TAM em astrócitos, mas isso tende a ocorrer de forma linhagem-específica.

**Figura 8** - Expressão gênica dos receptores TAM (AXL, TYRO3 e MERTK).



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Expressão gênica dos receptores TAM (AXL, TYRO3 e MERTK) nas duas linhagens de astrócitos estudadas, verificada por qPCR. A) Análise individual da expressão desses receptores em condição livre de infecção, em que L1 foi adotada como referência para os cálculos de expressão relativa ( $*p=0,0044$  para AXL;  $**p=0,0035$  para TYRO3). B) Nos astrócitos L1 infectados com ZIKV<sup>BR</sup>, 48 h.p.i., todos os receptores têm sua expressão elevada em ambos os MOI estudados (1 e 10) ( $***p=0,0006$  e  $**p=0,0015$  para AXL;  $*p=0,0232$  e  $*p=0,0373$  para MERTK;  $***p=0,0008$  e  $**p=0,0011$  para TYRO3). C) Já no caso de astrócitos L2, há diferenças significantes apenas na expressão de AXL e TYRO3 em MOI 1 ( $*p=0,0493$  e  $*p=0,0306$ , respectivamente). Foram realizados dois experimentos de qPCR com as mesmas amostras de duas linhagens celulares distintas, em duplicata. ZB1 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 1. ZB10 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 10.

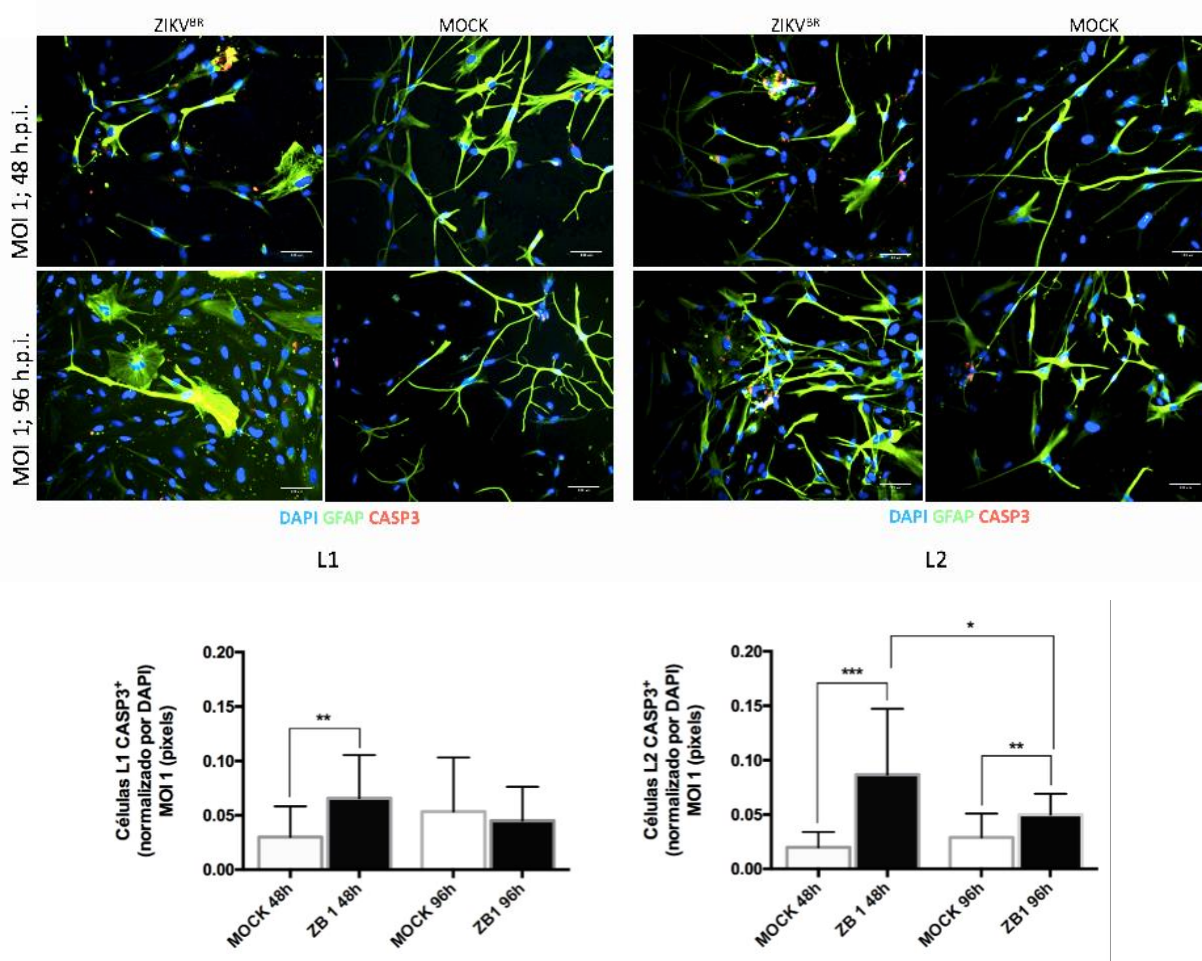
#### *5.1.4 Análise de morte celular por expressão protéica de Caspase-3*

Utilizando ensaios de imunofluorescência, também verificamos a morte celular pela expressão positiva de Caspase-clivada-3 (CASP3), a qual foi quantificada por pixels (Figuras 9 e 10).

Nos gráficos abaixo, observamos aumento de CASP3 em astrócitos infectados em relação a MOCK nas duas linhagens em ambos os MOI estudados em 48 h.p.i.. Já em 96 h.p.i., apenas células L2 infectadas apresentam diferenças significantes quando comparadas a MOCK nos dois MOI. Além disso, em MOI 1, ao contrário do que se vê em L1, observamos uma diminuição significativa da expressão de CASP3 entre 48 e 96 h.p.i. nos astrócitos L2 (Figura 9). Em MOI 10, este mesmo padrão foi visualizado para estas células, inclusive para L1 (Figura 10).



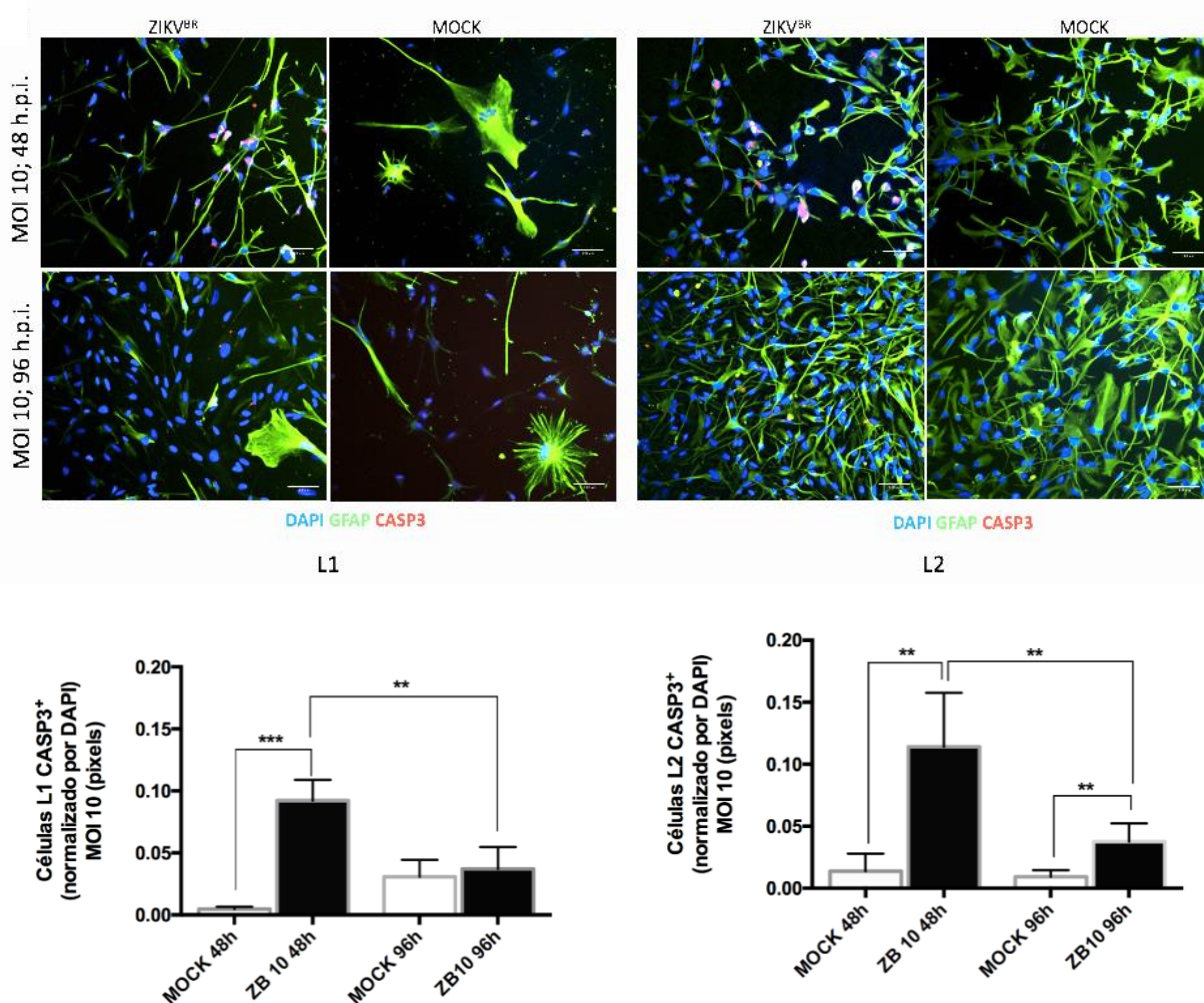
**Figura 9** - Expressão de CASP3 em astrócitos 48 e 96 horas pós-infecção com ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1).



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Presença de Caspase-3 clivada (CASP3) em cultura de astrócitos infectados com ZIKV<sup>BR</sup> (48 e 96 h.p.i.) vista por imunofluorescência e suas respectivas quantificações por pixels, em MOI 1 (Barra de escala: 100  $\mu$ m. Magnificação: 20x). Representação ilustrativa de astrócitos L1 e L2 GFAP-positivos, expressando CASP3 e sua respectiva representação gráfica em MOI 1, em que ambas as linhagens apresentam diferença significativa entre ZIKV<sup>BR</sup> e MOCK em 48 h.p.i. (\*\* $p=0,0082$  e \*\*\* $p=0,0003$ ). Em 96 h.p.i., apenas L2 apresenta tal diferença (\*\* $p=0,0091$ ), além de demonstrar um decréscimo de células CASP3-positivas entre esses dois tempos experimentais (\* $p=0,0332$ ). Para este MOI, foram realizados dois experimentos independentes com análise de 15 campos fotográficos de duas linhagens celulares distintas. O teste t não-pareado foi adotado como teste estatístico. ZB1 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 1.

**Figura 10** - Expressão de CASP3 em astrócitos 48 e 96 horas pós-infecção com ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 10).



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

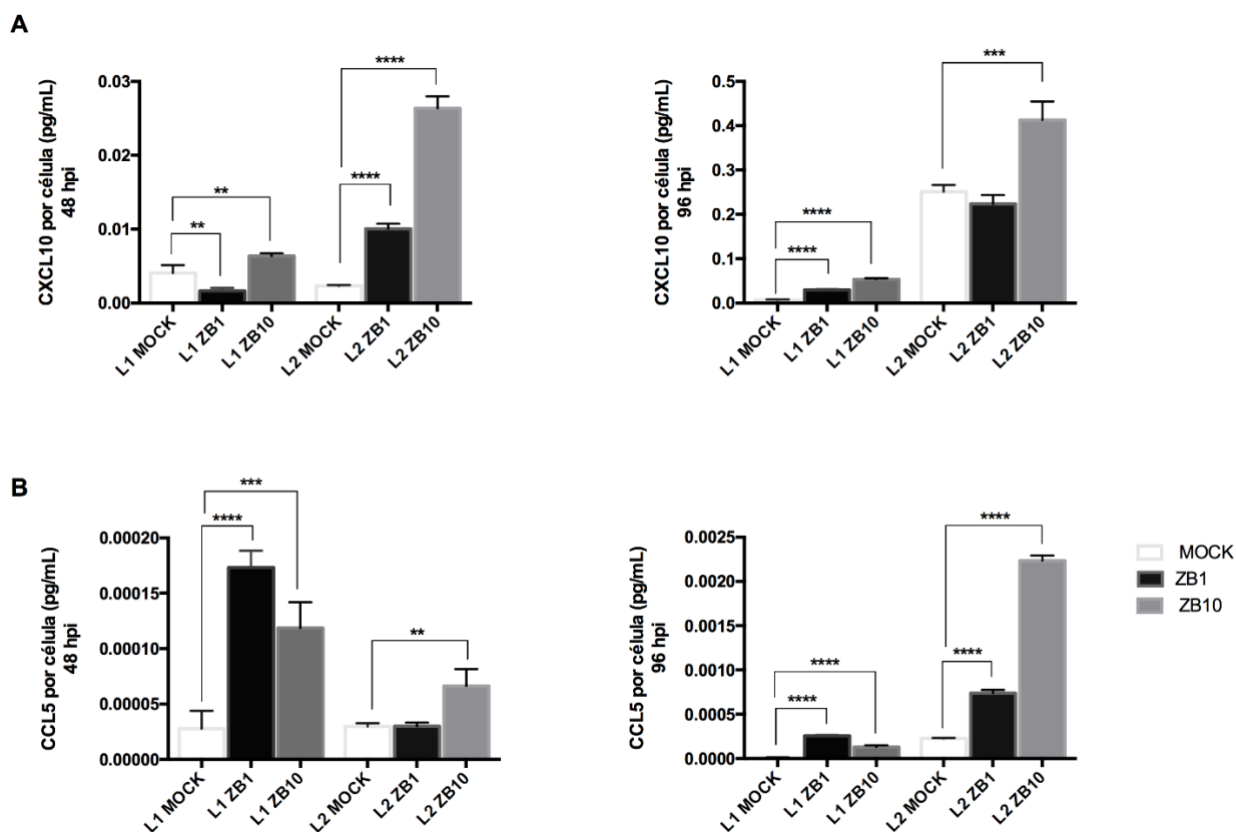
Legenda: Presença de Caspase-3 clivada (CASP3) em cultura de astrócitos infectados com ZIKV<sup>BR</sup> (48 e 96 h.p.i.) vista por imunofluorescência e suas respectivas quantificações por pixels, em MOI 10 (Barra de escala: 100  $\mu$ m. Magnificação: 20x). Representação ilustrativa de astrócitos L1 e L2 GFAP-positivos, expressando CASP3 e sua respectiva representação gráfica em MOI 10, em que tanto L1 quanto L2 apresentam diferenças entre ZIKV<sup>BR</sup> e MOCK em 48 h.p.i. (\*\* $p=0,0003$  para L1 e \*\* $p=0,0012$  para L2) e entre 48 e 96 h.p.i. (\*\* $p=0,002$  para L1 e \*\* $p=0,0012$  para L2). Como em MOI 1, L2 foi o único que demonstrou aumento de células infectadas marcadas por CASP3 em 96 h.p.i. (\*\* $p=0,0087$ ). Para este MOI, um único experimento foi realizado em que foram analisados no mínimo 5 campos. O teste t não-pareado foi adotado como teste estatístico. ZB10 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 10.

### *5.1.5 Análise da liberação de citocinas por astrócitos*

Quando analisamos o perfil de expressão de citocinas em astrócitos infectados por ZIKV<sup>BR</sup>, verificamos desregulações na liberação de algumas delas, como no caso das quimiocinas CXCL10/IP-10 e CCL5/RANTES pelos astrócitos L1 e L2 infectados nos MOI 1 e 10 (Figura 11). Podemos observar que, de forma geral, ZIKV<sup>BR</sup> é capaz de aumentar a liberação dessas quimiocinas pelas duas linhagens nos dois MOI.

Em nossos achados, a citocina IL-6 é altamente secretada em astrócitos infectados quando comparados a MOCK em praticamente todas as condições, exceto nas células L2 em 48 h.p.i. (MOI 1). (Figura 12).

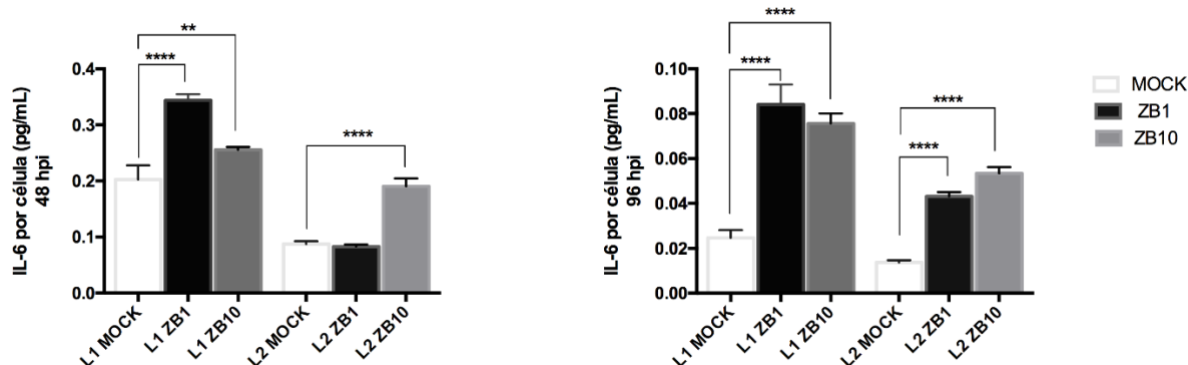
Figura 11 - Secreção de CXCL10 e CCL5 por astrócitos infectados.



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Concentrações de CXCL10 (A) e CCL5 (B) liberadas por astrócitos infectados por ZIKV<sup>BR</sup> mostram-se desreguladas em relação aos controles nos tempos experimentais observados. A) Com exceção das células infectadas L1 (MOI 1) em relação a MOCK em 48 h.p.i. (\*\* $p=0,0052$ ) e L2 (MOI 1) em 96 h.p.i., observamos aumento da liberação de CXCL10 em células infectadas de forma MOI-dependente em todas as condições. B) Para CCL5, astrócitos infectados também apresentam elevação em sua secreção, salvo L2 (MOI 1) em 48 h.p.i.. As citocinas foram normalizadas por quantidade total de células, sendo representadas em níveis liberados por uma unidade celular. Para este ensaio único de Luminex, foram analisados sobrenadantes em quadruplicata de duas linhagens celulares distintas, para cada condição. Foi adotado o teste t não-pareado como análise estatística (\*\* $p=0,0067$  para L1 ZB10 x MOCK em CXCL10 48 h.p.i., \*\*\* $p=0,0003$  para L2 ZB10 x MOCK em CXCL10 96 h.p.i., \*\*\* $p=0,0007$  para L1 ZB10 x MOCK em CCL5 48 h.p.i., \*\* $p=0,0036$  para L2 ZB10 x MOCK em CCL5 48 h.p.i. e \*\*\*\* $p<0,0001$ ). ZB1 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 1; ZB10 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 10.

**Figura 12 - Liberação de IL-6 por astrócitos infectados.**

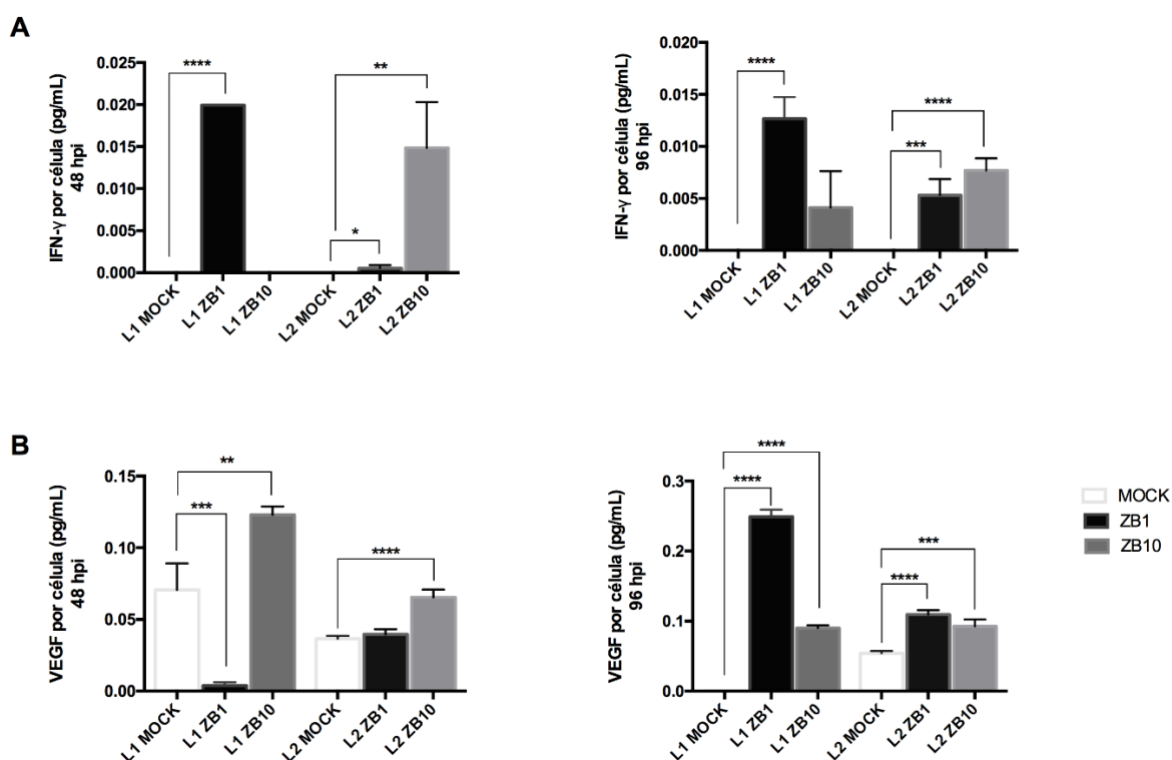


Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: A infecção de astrócitos por ZIKV<sup>BR</sup> leva à produção aumentada da citocina pró-inflamatória IL-6. Astrócitos L1 infectados nos dois MOI apresentam alteração em relação a MOCK (\*\* $p=0,0063$  e \*\*\*\* $p<0,0001$ ) nos dois tempos experimentais, enquanto L2 responde de forma similar com exceção da condição MOI 1 em 48 h.p.i. (\*\*\*\* $p<0,0001$ ). Observa-se que as citocinas foram normalizadas por quantidade total de células, sendo representadas em níveis liberados por uma unidade celular. Para este ensaio único de Luminex, foram analisados sobrenadantes em quadruplicata de duas linhagens celulares distintas, para cada condição. Foi adotado o teste t não-pareado como análise estatística. ZB1 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 1; ZB10 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 10.

Padrões de resposta semelhantes são visualizados quando analisamos as citocinas IFN- $\gamma$  e VEGF (Figura 13). Exceto no caso de células L1 infectadas (MOI 1) em 48 h.p.i. (que secretam menos VEGF que seus controles) e na expressão nula de IFN- $\gamma$  por células L1 infectadas em MOI 10, em todas as demais condições vimos que o ZIKV<sup>BR</sup> tende a induzir a secreção dessas citocinas em nossos astrócitos.

**Figura 13 - Produção de IFN- $\gamma$  e VEGF por astrócitos infectados.**



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

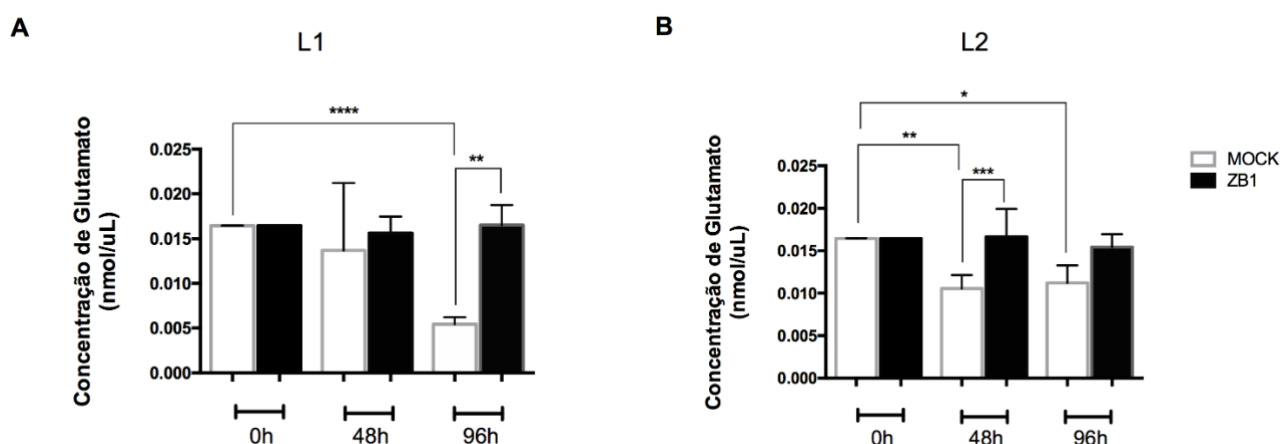
Legenda: Astrócitos L1 e L2 infectados por ZIKV<sup>BR</sup> tendem a produzir maiores concentrações de IFN- $\gamma$  e VEGF. De uma forma geral, essas citocinas encontram-se altamente expressas em todas as condições, salva a redução de VEGF em células L1 infectadas (MOI 1) em 48 h.p.i. ( $***p=0,0004$ ). Os astrócitos dessa linhagem não liberam IFN- $\gamma$  em um primeiro momento quando são infectados em um MOI maior e isso se reflete em um aumento de expressão não-significativa 48 horas depois. Para este ensaio único de Luminex, foram analisados sobrenadantes em quadruplicata de duas linhagens celulares distintas, para cada condição. Foi adotado o teste t não-pareado como análise estatística ( $*p=0.0312$ ,  $**p=0.0016$  para L2 ZB1 x MOCK em IFN- $\gamma$  48 h.p.i.,  $***p=0,0005$  para L2 ZB1 x L1 MOCK em IFN- $\gamma$  96 h.p.i.,  $**p=0,0017$  para L1 ZB10 x MOCK em VEGF 48 h.p.i.,  $***p=0,0003$  para L2 ZB10 x L1 MOCK em VEGF 96 h.p.i. e  $****p<0.0001$ ). ZB1 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 1; ZB10 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 10.



### 5.1.6 Análise de glutamato extracelular e da expressão gênica de seus transportadores

Níveis de glutamato extracelular em 48 e 96 h.p.i. também foram analisados para observar uma possível dinâmica de captação desse neurotransmissor pelos astrócitos após a infecção com ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1) a partir de uma concentração inicial de 0,016 nmol/μL em meio AGM puro (designado como "tempo zero" ou 0h). Nos diferentes pontos experimentais (48 h.p.i. para L2 e 96 h.p.i. para L1), vimos menores concentrações de glutamato no sobrenadante de astrócitos L1 e L2 não-infectados, se comparados aos infectados. Para L1, esse decréscimo em sobrenadante de células MOCK é estatisticamente relevante apenas de 0 para 96 h.p.i., enquanto para L2 isso ocorre de 0 para 48 h.p.i. e de 0 para 96 h.p.i. (Figura 14).

**Figura 14** - Concentração de glutamato em meio sobrenadante de astrócitos pós-infecção com ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1).

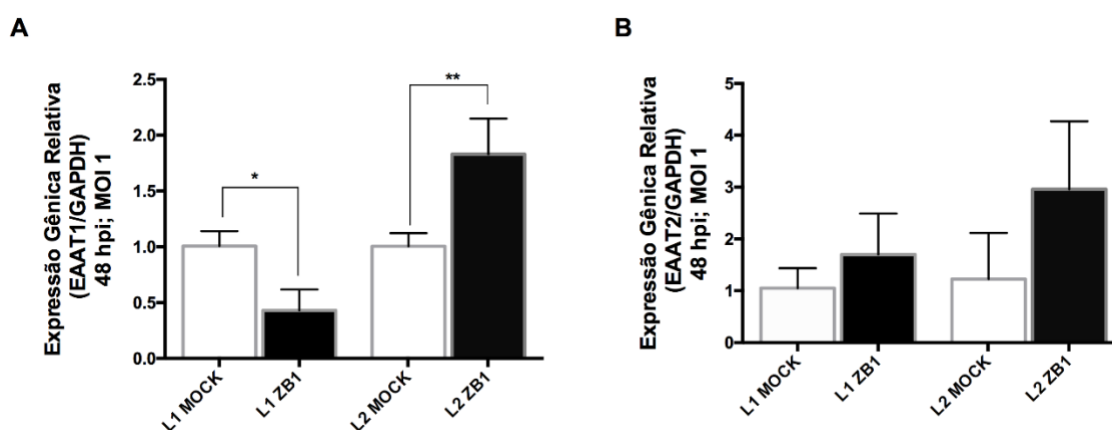


Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Análise de captação de glutamato por astrócitos L1 (B) e L2 (C) infectados, em 0, 48 e 96 h.p.i.. A) De forma similar, para L1 ocorre uma redução dos níveis de glutamato do tempo zero para 96 h.p.i. em MOCK (teste t pareado,  $**p < 0,0001$ ). Neste mesmo ponto experimental, essa mesma condição encontra-se significativamente reduzida quando a comparamos à condição ZIKV<sup>BR</sup> (teste t não-pareado,  $**p = 0,0041$ ). B) Já ao analisar L2, a diminuição significativa observada é vista em 48 h.p.i. (teste t não-pareado,  $***p = 0,0004$ ). Tanto neste tempo quanto em 96 h.p.i., é notável essa queda dos níveis de glutamato em células MOCK, comparada aos níveis iniciais (teste t pareado,  $**p = 0,0075$  e  $*p = 0,0277$ , respectivamente). Os níveis de glutamato foram normalizados pela quantidade total de células. Para este ensaio único, foram analisados sobrenadantes em duplicata a partir de dois experimentos de infecção de duas linhagens celulares distintas, para cada condição. ZB1 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 1.

Ao mesmo tempo, a expressão dos transportadores de glutamato EAAT1 e EAAT2 também foi verificada a nível transcricional após infecção com ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1). Com 48 h.p.i. EAAT1 aparece significativamente desregulado após a infecção: encontra-se reduzido em astrócitos L1 infectados em relação ao controle, enquanto o oposto é observado em L2 (Figura 15A). Já EAAT2 apenas aparenta ter sua expressão aumentada em células L2 infectadas, no entanto essa diferença não é significativa (Figura 15B).

**Figura 15** - Expressão gênica de transportadores de glutamato em astrócitos infectados por ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1).



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Análise da expressão gênica de EAAT1 e EAAT2, transportadores de glutamato comumente expressos em astrócitos, por meio da técnica de qPCR, em 48 h.p.i. (MOI 1). A) Uma diminuição significativa de EAAT1 é vista em células L1 infectadas e aumento em L2 infectadas (teste t pareado,  $*p=0,0275$  e  $**p=0,0090$ ). B) Visualizamos apenas uma tendência de aumento não-significativo da expressão de EAAT2 em astrócitos L2 infectados. Foram realizados dois experimentos independentes de infecção com análise de duplicatas de duas linhagens celulares distintas. ZB1 = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 1.

### 5.1.7 Análise de sinaptogênese em neurônios

A fim de avaliar se astrócitos infectados poderiam afetar funcionalmente a atividade sináptica neuronal, neurônios L2 foram mantidos em duas condições distintas: em meio condicionado - e livre de vírus - de astrócitos previamente infectados desta mesma linhagem ou na presença dos próprios astrócitos infectados (cocultura).

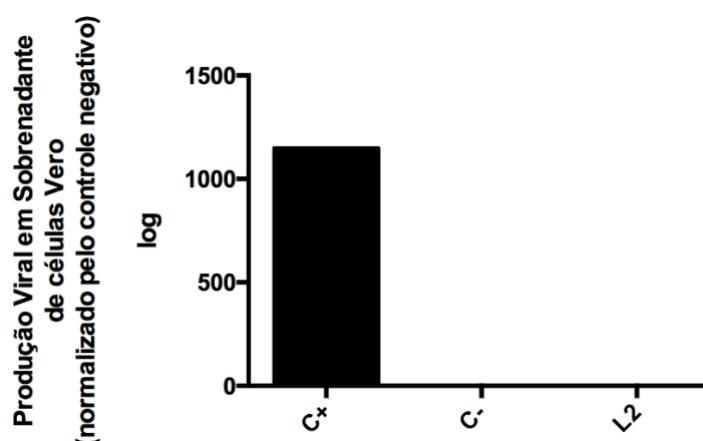


### 5.1.7.1 Análise de sinaptogênese em neurônios cultivados com sobrenadantes de astrócitos infectados (MOI 1)

Com 48 h.p.i., o meio sobrenadante de astrócitos infectados foi coletado e ultracentrifugado para que o vírus pudesse ser descartado ao final do processo, restando assim apenas os produtos metabólicos destes astrócitos pós-infecção.

A fim de comprovar que os sobrenadantes estavam livres de vírus após a ultracentrifugação antes de serem utilizados na cultura neuronal, estes foram plaqueados sobre células Vero, que foram mantidas em cultura por uma semana. O sobrenadante dessas células foi coletado para verificar se havia produção viral ao final desse período pelo ensaio de qPCR, o qual mostrou a ausência de RNA viral (Figura 16).

**Figura 16** - Ausência de RNA viral em meio condicionado ultracentrifugado de astrócitos infectados.



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

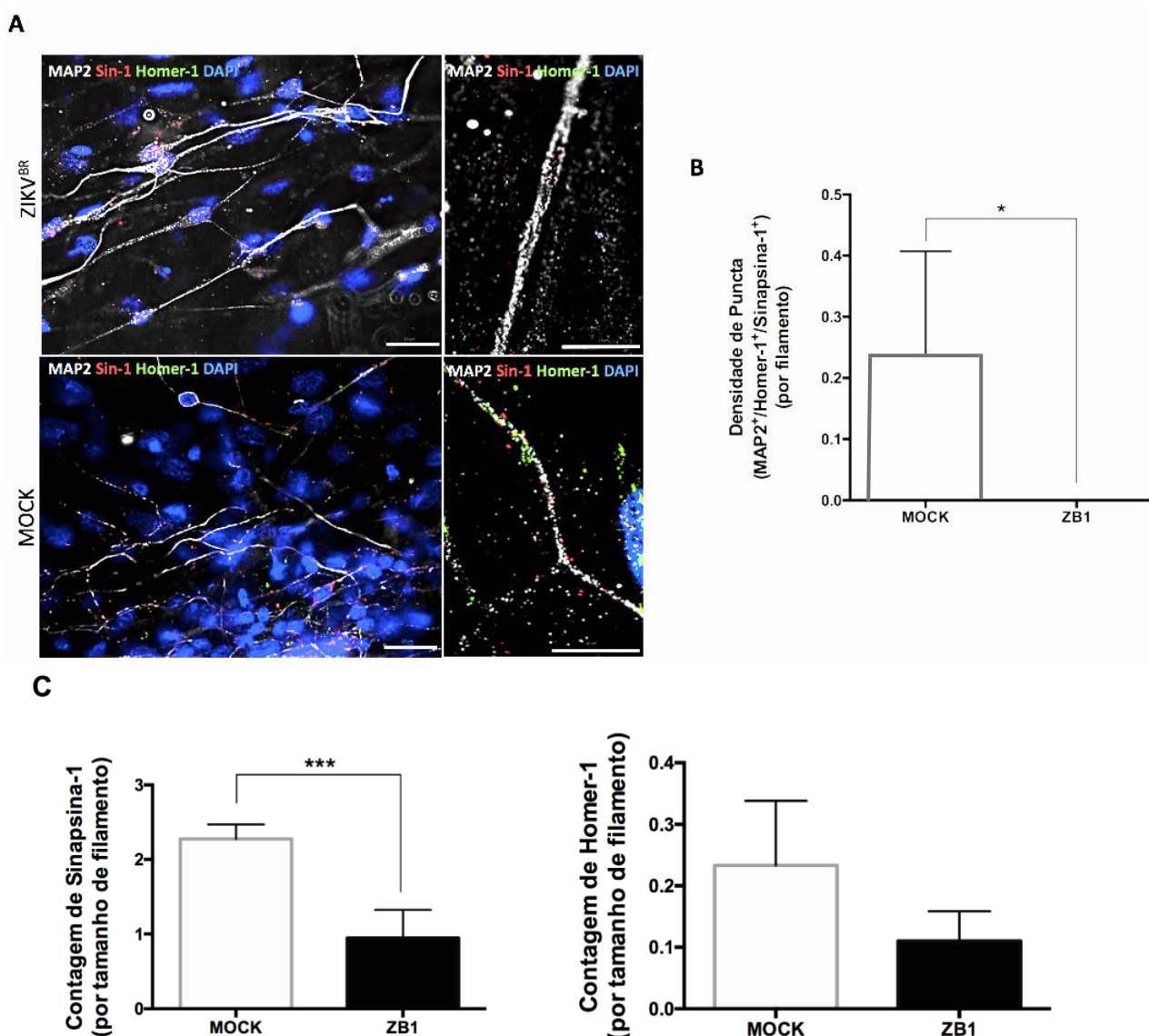
Legenda: Análise de sobrenadantes de células Vero por meio da técnica de qPCR, cultivadas com meio condicionado ultracentrifugado de astrócitos L2 infectados (48 h.p.i.) por uma semana. Este único experimento foi feito usando monocatas de sobrenadante.

Sendo assim, as células neuronais permaneceram em cultura com este meio condicionado por uma semana para posterior avaliação de sinaptogênese por meio da técnica de imunofluorescência. Estes neurônios demonstraram nenhuma colocalização (puncta) das proteínas pré- e pós-sinápticas Sinapsina-1 e Homer-1, respectivamente. No entanto, quando analisadas separadamente, apenas Sinapsina-1 teve sua expressão diminuída da condição MOCK para a condição ZIKV<sup>BR</sup> (Figura 17).

#### 5.1.7.2 Análise de sinaptogênese em neurônios cocultivados com astrócitos infectados com ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1)

Da mesma forma, neurônios L2 cocultivados com astrócitos L2 infectados durante 48 horas também tiveram menor número de punctas em relação a MOCK, ao mesmo tempo em que apenas a expressão individual de Homer-1 encontra-se reduzida em ZIKV<sup>BR</sup> (Figura 18).

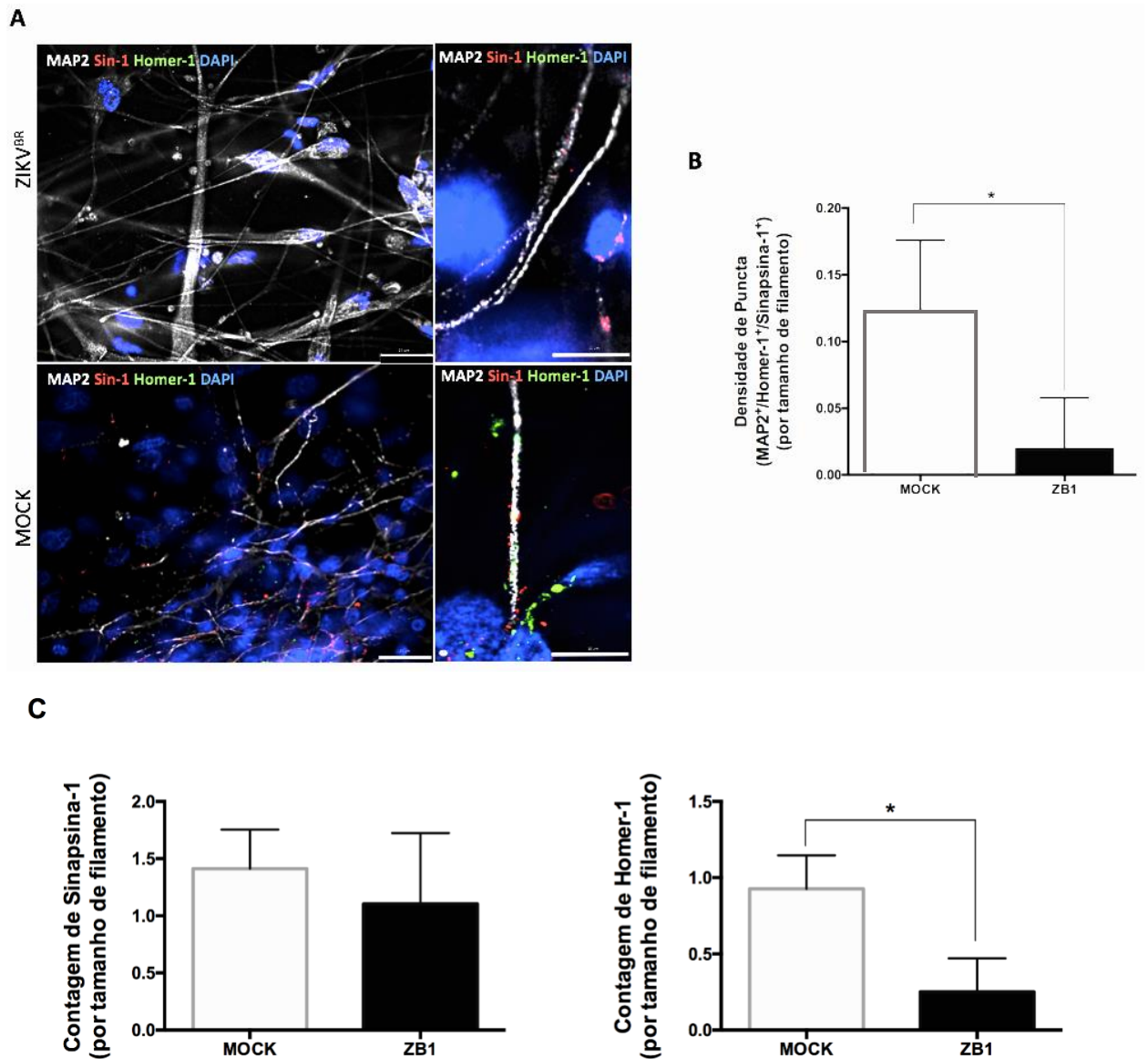
**Figura 17** - Análise de sinaptogênese em neurônios cultivados em meio sobrenadante de astrócitos infectados por ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1).



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Neurônios quando cultivados com sobrenadantes ultracentrifugados de astrócitos infectados, demonstram diminuição da atividade sinaptogênica, medida pelo número de colocalizações entre as proteínas pré- e pós-sináptica Sinapsina-1 e Homer-1, respectivamente. A) Representação ilustrativa de neurônios nas condições ZIKV<sup>BR</sup> e MOCK (Barra de escala: 25  $\mu$ m e 10  $\mu$ m. Magnificação: 63x e 100x). B) Número de colocalizações (punctas), que chega a ser nula na condição ZIKV<sup>BR</sup> (\* $p=0,0275$ ; teste t não-pareado). C) Contagem de Sinapsina-1 e Homer-1, separadamente, em que apenas a primeira proteína encontra-se com expressão significativamente reduzida em neurônios da condição ZIKV<sup>BR</sup> (\*\* $p=0,0007$ ; teste t não-pareado). Neste experimento único, foi analisada uma média de 11 filamentos de tamanho igual em 4 campos fotográficos para cada condição.

**Figura 18** - Análise de sinaptogênese em neurônios cocultivos com astrócitos infectados por ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1).



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Após 48 horas de infecção de astrócitos por ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1), estes foram submetidos à cocultura com neurônios por uma semana. A) Representação ilustrativa de neurônios nas condições ZIKV<sup>BR</sup> e MOCK (Barra de escala: 25  $\mu$ m e 10  $\mu$ m. Magnificação: 63x e 100x). B) Ao final de 7 dias, as células neuronais aparentam possuir menor atividade sinaptogênica, medida pelo número de punctas entre Sinapsina-1 e Homer-1 ( $*p=0,0177$ ; teste t não-pareado). C) Análise da expressão individual de Sinapsina-1 e Homer-1, em que o último apresenta diminuição significativa de sua expressão na condição ZIKV<sup>BR</sup> em relação a MOCK ( $*p=0,101$ ; teste t não-pareado). Neste experimento único, foi analisada uma média de 10 filamentos de tamanho igual em 4 campos fotográficos para cada condição.

## 5.2 ANÁLISE DE ASTRÓCITOS DERIVADOS DE NPC INFECTADAS POR ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1)

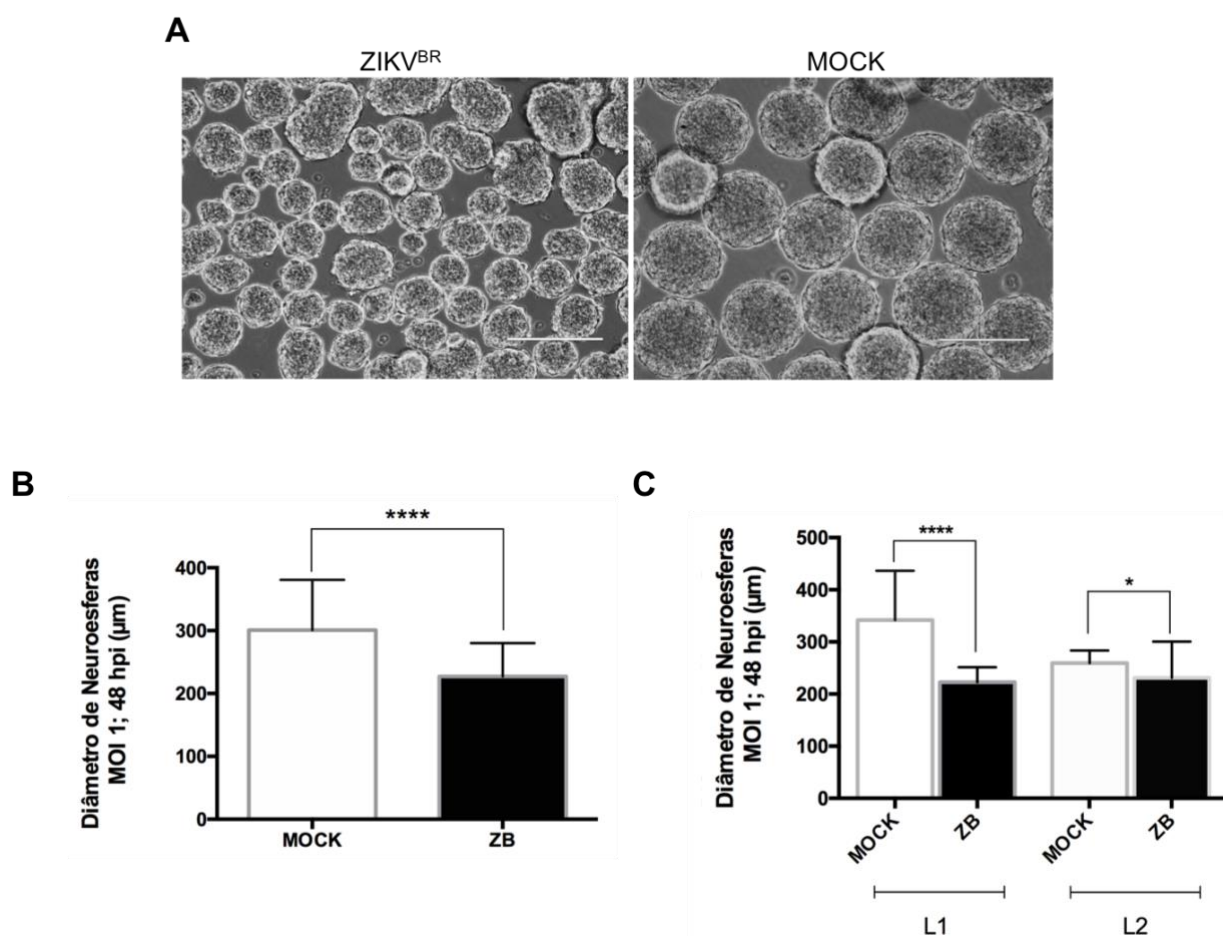
A seguir, descrevemos os achados dos experimentos com astrócitos derivados de NPC infectadas (um processo denominado por nós de “astrogliogênese infectada”):

### 5.2.1 Geração de astrócitos derivados de NPC infectadas

Em paralelo aos experimentos relacionados à infecção de astrócitos, NPC foram infectadas por ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1) para sua derivação em astrócitos para o estudo da astrogliogênese afetada pela infecção por ZIKV<sup>BR</sup>. No entanto, quando as NPC foram infectadas em MOI 10, a viabilidade de neuroesferas foi muito baixa (isto é, apenas uma minoria de células aderiu às placas de poliornitina e laminina, com liberação reduzida de astrócitos), o que nos impediu de realizar experimentos usando este MOI.

Para MOI 1, subsequentemente, o diâmetro das neuroesferas foi analisado 48 horas após a infecção de NPC e mostrou que o vírus afeta a viabilidade celular nestas estruturas, o que consequentemente resulta em uma diminuição no diâmetro de neuroesferas infectadas. A figura 19 mostra uma imagem representativa de neuroesferas e a quantificação de seu diâmetro após 48 horas de infecção com ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1). Observa-se também que para ambas as linhagens, o diâmetro dessas estruturas encontra-se reduzido quando há infecção das NPC.

**Figura 19** - Análise do diâmetro de neuroesferas derivadas de NPC infectadas durante o processo de diferenciação de astrócitos.

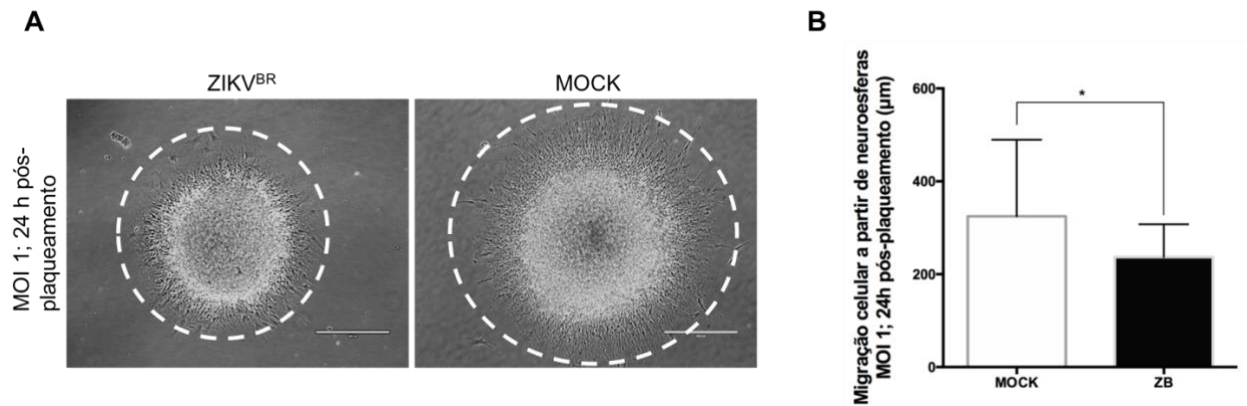


Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: A infecção de NPC com ZIKV<sup>BR</sup> em MOI 1, 48 h.p.i. A) Observa-se diferenças morfológicas em neuroesferas infectadas com ZIKV<sup>BR</sup> em comparação às neuroesferas-controle. Barra de escala: 200 μm. Magnificação: 20x. B) Quantificação do diâmetro das neuroesferas após 48 horas de infecção, considerando análise grupal entre ZIKV<sup>BR</sup> e MOCK (teste t não-pareado, \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). C) Análise individual quanto ao diâmetro de neuroesferas de L1 e L2, separadamente (teste t não-pareado, \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \* $p = 0,0138$ ). Para este dado, foram analisadas 42 neuroesferas de cada grupo derivadas de um experimento, para as duas linhagens celulares distintas. ZB = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 1.

Além disso, para testar o potencial migratório das células em cultura aderente, a migração de astrócitos ao final do período de diferenciação de astrócitos também foi medida de forma que, 24 horas pós-plaqueamento das neuroesferas em placas tratadas com poliornitina e laminina, as células derivadas dessas estruturas, após o processo de diferenciação infectada, migraram menos do que as derivadas de neuroesferas MOCK (Figura 20).

**Figura 20** - Diferenças na migração de astrócitos a partir de neuroesferas derivadas de NPC infectadas.



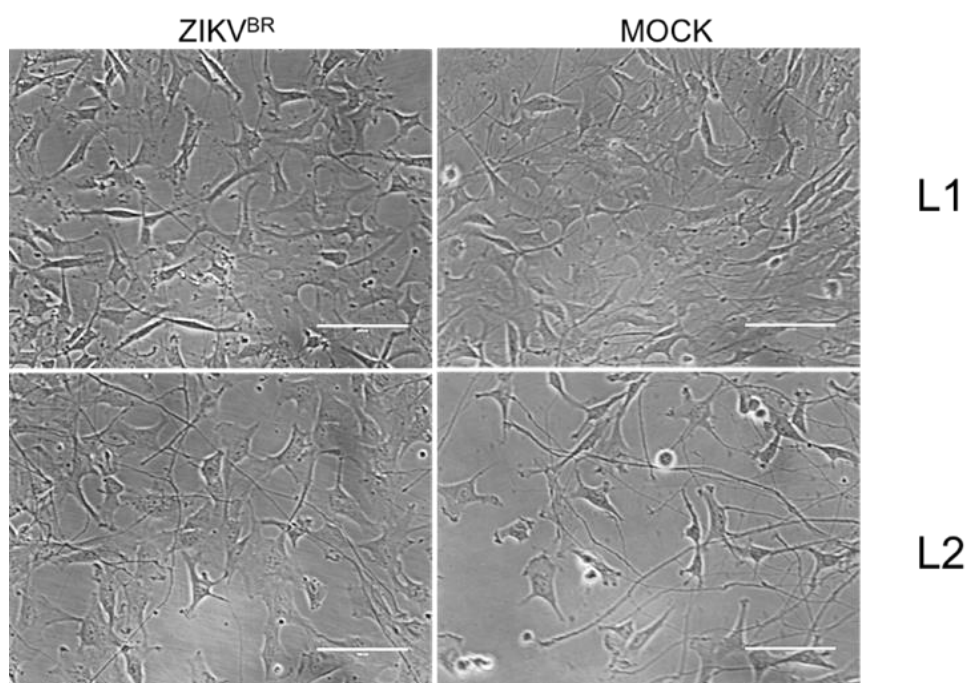
Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Ilustração e quantificação do processo migratório de astrócitos a partir de neuroesferas em cultura aderente, ao final do processo de diferenciação de astrócitos pós-infecção com ZIKV<sup>BR</sup> em MOI 1. A) Visualmente, observa-se maior tendência migratória dos astrócitos (destacada pela linha tracejada) a partir de neuroesferas derivadas de NPC infectada em comparação às neuroesferas-controle, após 24 horas após seu plaqueamento em placas tratadas com poliornitina e laminina. Barra de escala: 400 μm. Magnificação: 10x. B) Quantificação da migração celular neste mesmo tempo de análise entre os grupos ZIKV<sup>BR</sup> e MOCK (teste t não-pareado, \* $p=0.0316$ ). Pela quantificação, vemos que astrócitos derivados de astrogliogênese infectada (MOI 1) realmente tendem a migrar menos quando analisados 24 horas pós-plaqueamento. Foram realizados dois experimentos independentes, em que foram analisadas, no mínimo, 34 neuroesferas MOCK e 19 neuroesferas ZIKV<sup>BR</sup>, para as duas linhagens celulares distintas. ZB = ZIKV<sup>BR</sup> MOI 1.

Na figura 21, notamos que a infecção não impediu a geração de astrócitos a partir de NPC infectadas.



**Figura 21** - Astrócitos L1 e L2 derivados de astroglíogênese infectada.



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

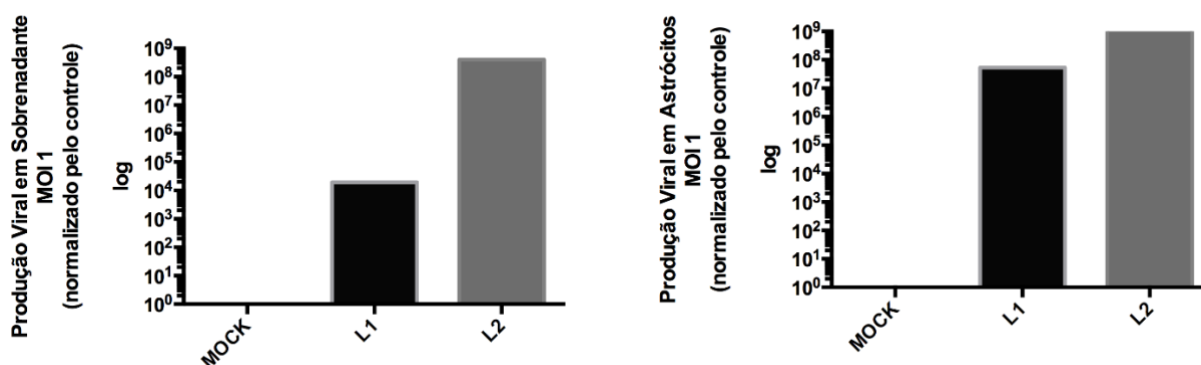
Legenda: Astrócitos das duas linhagens estudadas, derivadas de NPC infectadas (MOI 1), após o plaqueamento de neuroesferas em placas aderentes de poliornitina e laminina, vistos por microscopia de contraste de fase. Não são visualizadas diferenças discrepantes e efeitos citopáticos entre células infectadas por ZIKV<sup>BR</sup> e MOCK. (Barra de escala: 100  $\mu$ m. Magnificação: 40x).



### 5.2.2 Presença viral em astrócitos derivados de astroglíogênese infectada

Ao final do período de diferenciação, sobrenadantes e RNA celular foram coletados para averiguar se o vírus persistia nos astrócitos mesmo após o processo de derivação de astrócitos a partir de NPC infectadas. Conforme mostra a figura 22, o RNA viral encontra-se presente nos meios extra e intracelular nas linhagens analisadas.

**Figura 22** - Presença de RNA viral no sobrenadante e no interior de astrócitos derivados de NPC infectadas.



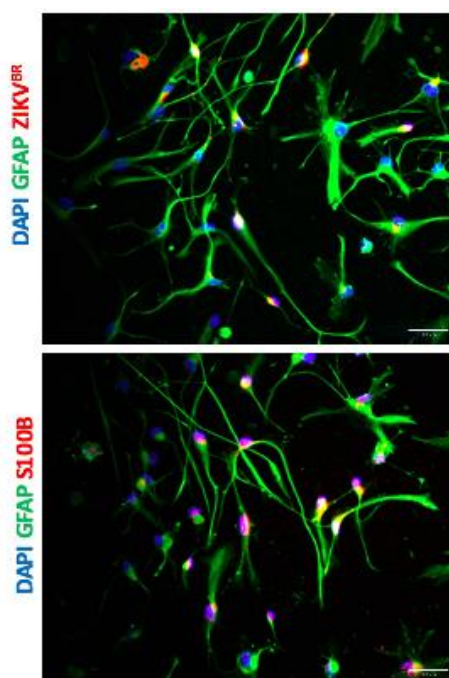
Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Após o término do processo de astroglíogênese infectada (MOI 1), aproximadamente um mês pós-infecção de NPC, a produção viral em sobrenadantes e no interior dos astrócitos L1 e L2 foram quantificados. Os dados foram normalizados pelo controle (MOCK) nos cálculos de  $2^{-\Delta C_t}$  (nenhuma análise estatística empregada). Nenhuma análise estatística foi empregada. Foi realizado um único experimento de qPCR com análise de amostras de RNA em monocata das duas linhagens celulares distintas abordadas neste estudo.

Embora essas análises tenham sido possíveis, os astrócitos L1 derivados de astroglíogênese infectada não conseguiram permanecer em cultura tempo suficiente para serem analisados quanto à sua expressão protéica por imunofluorescência. Em um primeiro experimento, problemas técnicos de manutenção celular em incubadora impossibilitaram a realização desta técnica e nos dois experimentos seguintes, observamos que as neuroesferas não eram viáveis quando plaqueadas em placas aderentes de poliornitina e laminina ou que sua passagem e subsequente aderência nas placas eram prejudicadas, o que impossibilitou a realização do ensaio de imunofluorescência.

O contrário ocorreu para L2, que conseguiu gerar astrócitos viáveis que sobreviveram a passagens celulares. Como podemos ver na figura 23, os astrócitos L2 são S100B- e GFAP-positivos e, no caso de células infectadas, apresentam marcação de proteínas virais em seu interior.

**Figura 23** - Presença de proteínas virais no interior de astrócitos L2 derivados de NPC infectadas e caracterização de astrócitos com marcação de GFAP e S100B.



Fonte: OHKI, C.M.Y. (2019)

Legenda: Representação ilustrativa de astrócitos L2 derivados de astrogliogênese infectada, analisados quanto à expressão protéica de GFAP e S100B, demonstrando sua maturação. As imagens de imunofluorescência também mostram a presença de proteína viral (ZIKV<sup>BR</sup>) no interior dos astrócitos. (Barra de escala: 100  $\mu$ m. Magnificação: 20x).

## 6 DISCUSSÃO

Neste projeto, buscamos avaliar, sob diferentes aspectos, se o ZIKV<sup>BR</sup> causaria efeitos deletérios em astrócitos. Para tanto, nossos modelos foram astrócitos derivados de iPSC humanas de linhagens correspondentes a dois indivíduos neurotípicos não-relacionados geneticamente (L1 e L2), produzidos em nosso laboratório (RUSSO et al., 2018) e previamente usados para mapear a infecção do ZIKV em NPC e neurônios (CUGOLA et al., 2016). Para tanto, decidimos tanto investigar o fenótipo apresentado por astrócitos infectados quanto checar se o processo de diferenciação destas células seria possível quando suas progenitoras eram infectadas.

A discussão deste trabalho será descrita a seguir de forma dividida em subseções: a primeira sobre os resultados obtidos em astrócitos infectados e a segunda, em astrócitos derivados de NPC infectadas.

### 6.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DA INFECÇÃO VIRAL DE ASTRÓCITOS A PARTIR DE iPSC HUMANAS

Neste trabalho, a eficiência do protocolo de diferenciação de astrócitos a partir de NPC foi verificada pela obtenção de astrócitos GFAP- e S100B-positivos, marcadores que indicam que estas células encontram-se terminalmente diferenciadas (RAPONI et al., 2007), prontas para serem infectadas por ZIKV<sup>BR</sup>. Após a infecção destes astrócitos, confirmamos a ocorrência da infecção pela localização perinuclear de proteína de flavivírus (ZIKV<sup>BR</sup>) (como previamente reportado em casos de infecção celular por essa família de vírus (UCHIL; KUMAR; SATCHIDANANDAM, 2006), mostrando que ambas são susceptíveis, o que está de acordo com outros estudos envolvendo astrócitos humanos infectados (HAMEL et al., 2017; HUANG et al., 2018; STEFANIK et al., 2018). No entanto, quando observamos L1 em MOI 10, vemos que o número de células infectadas decresce de 48 para 96 horas, o que poderia sugerir aumento da morte destes astrócitos ZIKV-positivos ou aumento no número daqueles que não foram infectados por possível proliferação - comumente vista na astrogliose (RIDET et al., 1997), uma característica observada em amostras cerebrais de fetos com SCZ (MLAKAR et al., 2016).

Já ao identificar a presença de RNA viral nos meios extra e intracelular, pudemos notar que este não estava presente em sobrenadante de células L1 mas apenas em seu interior, o que poderia revelar uma característica do estágio do ciclo infectivo viral, possivelmente estando os vírus naquele momento na fase de eclipse ou alguma outra etapa de replicação viral sem a liberação de vírus para o meio extracelular. Tal possibilidade também poderia estar relacionada ao observado em L2, em que há um comportamento invertido em relação ao obtido para L1, na condição MOI 1 no período de 48 h.p.i.: neste caso o ciclo replicativo possivelmente estaria numa etapa posterior, com a liberação de vírus no sobrenadante. De todo modo, considerando que o inóculo não permanece no sobrenadante das células após o momento da infecção e que o RNA viral foi detectado algumas horas após a inoculação, podemos afirmar que nossos astrócitos são susceptíveis e permissíveis ao ZIKV<sup>BR</sup>, assim como visto por outro estudo que utilizou a mesma linhagem brasileira (STEFANIK et al., 2018).

Com o intuito de avançar na investigação dos mecanismos utilizados pelo vírus para infectar astrócitos, procuramos verificar uma provável porta de entrada utilizada pelo ZIKV<sup>BR</sup> para infectar células neurais: os receptores TAM, implicados na entrada viral em astrócitos (LIMONTA et al., 2018; MEERTENS et al., 2017; RETALLACK et al., 2016) e na evasão de resposta imune pelo vírus (CHEN et al., 2018). Em nossos resultados, a análise dos transcritos que codificam esses receptores em astrócitos antes da infecção mostra que L2 poderia ser mais susceptível à entrada do vírus pela tendência em expressar mais receptores TAM que L1, sugerindo que este pudesse ser mais vulnerável à indução da expressão de receptores TAM pelo ZIKV<sup>BR</sup>.

Na prática, isso realmente aconteceu: após a infecção, o vírus induziu o aumento da expressão destes receptores, principalmente em L1. Isso já foi demonstrado na análise de NPC, que apresenta expressão transcriptômica elevada de receptores candidatos (sobretudo de AXL) pós-infecção com ZIKV *in vivo* e em macrófagos/microglias derivadas de iPSC humanas, em que essas células apresentaram aumento na expressão gênica de TYRO3 e AXL 24 horas após a infecção com a mesma cepa de ZIKV utilizada neste trabalho (MESCI et al., 2018a).

Sendo assim, nos questionamos se essas diferenças de expressão de receptores TAM, antes e depois da infecção, poderiam eventualmente refletir em diferentes padrões de respostas celulares de L1 e L2 frente ao vírus.

A fim de verificar respostas celulares frente à infecção e considerando que os astrócitos são capazes de secretar mediadores pró-inflamatórios na tentativa de combater a infecção e, ao mesmo tempo, outros fatores neuroprotetores para a manutenção do microambiente neural (BRAHMACHARI, 2006), verificamos a resposta imunológica contra o ZIKV<sup>BR</sup> testando o perfil de citocinas produzidas após 48 e 96 h.p.i. no sobrenadante de cultura, usando um ensaio de Luminex.

De maneira geral, vemos que a infecção dos astrócitos gerados neste projeto por ZIKV<sup>BR</sup> induz a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas previamente descritas em outros estudos de astrócitos infectados com outros flavivírus, como o (TBEV, do inglês "*Tick-Borne Encephalitis Virus*"), Vírus da Encefalite Japonesa (JEV, do inglês "*Japanese Encephalitis Virus*") e o Vírus do Nilo ocidental (WNV, do inglês "*West Nile Virus*"), como IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , CCL5/RANTES e CXCL10/IP-10 (BHOWMICK et al., 2007; CHEN et al., 2004; PALUS et al., 2018; VERMA; KUMAR; NERURKAR, 2011). Quanto ao ZIKV, mais especificamente, astrócitos primários humanos já foram analisados quanto a resposta imune após a infecção pelas cepas africana e brasileira. No trabalho recente de STEFANIK et al., 2018, apenas os níveis de expressão de IL-6, IL-8, IL-12, CCL5/RANTES e CXCL10/IP-10 por astrócitos infectados com ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 0,1) foram significativamente elevados quando comparados a controles, especialmente após 96 horas de infecção (STEFANIK et al., 2018).

Analisando as citocinas alteradas mais comuns encontradas nos casos de infecção de astrócitos por flavivírus, temos que CCL5/RANTES e CXCL10/IP-10 são duas quimiocinas importantes para o recrutamento de células imunes periféricas (como leucócitos) durante a neuroinflamação, comumente produzidas no contexto de infecção viral (BHOWMICK et al., 2007; CHEN et al., 2004; ZHANG et al., 2016). Além disso, já foi sugerido que CXCL10/IP-10, por um mecanismo dependente de TNF- $\alpha$  na infecção por JEV, poderia auxiliar na diminuição da expressão de proteínas juncionais em células endoteliais da BHE e conseqüentemente na promoção de sua ruptura (WANG et al., 2018).

Apesar de cada citocina apresentar propriedades que podem ser caracterizadas como pró- ou anti-inflamatórias de acordo com o contexto em que o SNC se encontra, IL-6 é uma citocina majoritariamente pró-inflamatória produzida por astrócitos em condições de injúria e inflamação do SNC e que pode também sofrer regulação autócrina. Além disso, essa liberação pode ser crucial para eventos como astrogliose, neurodegeneração e ruptura da BHE (CAMPBELL et al., 1993).

Já IFN- $\gamma$ , outra citocina pró-inflamatória essencial que possui propriedade antiviral (KANG; BROWN; HWANG, 2018), já foi associada com a promoção de astrogliose e com o comprometimento da integridade da BHE (BHOWMICK et al., 2007; CHAI et al., 2014; RAMESH; MACLEAN; PHILIPP, 2013). VEGF, por sua vez, está envolvida não apenas em mecanismos de neurogênese e angiogênese mas também com o potencial de danificar proteínas juncionais expressas por células endoteliais da BHE (ARGAW et al., 2009).

Ainda neste contexto, a comunidade científica tem demonstrado que a indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e desregulação da resposta imune acabam causando o aumento da permeabilidade da BHE como efeito secundário de infecção, como no exemplo nos casos de ZIKV, WNV, JEV e até mesmo o vírus da raiva, que *per se* não conseguem rompê-la (ALIMONTI et al., 2018; CHAI et al., 2014; LI et al., 2015; PAPA et al., 2017). Sabe-se também que esses vírus podem entrar passivamente no SNC, ultrapassando a BHE por meio da infecção de células endoteliais ou até mesmo via "cavalo de Tróia", um mecanismo em que leucócitos infectados migram da periferia ao SNC (o que já foi demonstrado pelo ZIKV para cruzar a placenta (LUM et al., 2017)). Visto isso, a desregulação no perfil de expressão de algumas citocinas desses astrócitos poderia ser um fator determinante para que o ZIKV<sup>BR</sup> conseguisse subverter a resposta imune desencadeada por ele, isto é, as citocinas altamente expressas por essas e outras células do microambiente neural acabam por comprometer a permeabilidade da BHE, o que auxilia ainda mais no processo de infecção viral do SNC, de modo similar ao que acontece para JEV (CHANG et al., 2015; LI et al., 2015). O contexto de neuroinflamação gerado pode contribuir então para os sinais clínicos de neuropatia vistas em alguns indivíduos adultos infectados por ZIKV<sup>BR</sup> (KAM et al., 2017). Contudo, a investigação do

mecanismo exato usado pelo ZIKV<sup>BR</sup> para invadir e infectar células do SNC ainda necessita ser mais aprofundada.

Sabe-se que o ZIKV é capaz de gerar a apoptose de outros tipos celulares infectados (MUFFAT et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018), inclusive NPC e neurônios derivados das mesmas linhagens utilizadas neste estudo (CUGOLA et al., 2016). Quando verificamos se o ZIKV<sup>BR</sup> poderia causar apoptose em nossos astrócitos em dois pontos experimentais, analisamos a marcação por CASP3. A ausência de diferença significativa entre células CASP3-positivas L1 em 96 h.p.i. nos dois MOI nos leva a considerar a hipótese de que esta linhagem se torne resistente à apoptose induzida pelo vírus - um fenótipo já visualizado em astrócitos fetais humanos infectados por ZIKV<sup>BR</sup> devido a possíveis alterações na dinâmica vírus-hospedeiro por mecanismos ainda desconhecidos (LIMONTA et al., 2018). Em L2, o ZIKV<sup>BR</sup> continua induzindo a morte celular em 96 h.p.i., porém, assim como o que acontece com L1 em MOI 10, em menor proporção. Uma vez que o RNA viral se mostra presente dentro e fora dos astrócitos em 96 h.p.i., a possibilidade de *clearance* viral ao longo do tempo diminui, mas aponta para as diferenças de resposta segundo o *background* genético de L1 e L2, como já relatamos anteriormente em outros tipos celulares (ROSA-FERNANDES et al., em preparação).

Quanto à funcionalidade de astrócitos, também procuramos identificar se alguma alteração funcional poderia ser vista em astrócitos infectados, uma vez que a função de captação de glutamato do meio extracelular é um processo importante exercido por essas células para evitar neurotoxicidade (ANDERSON; SWANSON, 2000), mas que pode estar desregulado frente a injúrias (MISHRA; KUMAWAT; BASU, 2008) e infecções virais (ZHOU et al., 2004). De fato, na análise da concentração de glutamato extracelular em dois pontos experimentais, vimos alterações significantes em que há relevante diminuição na concentração de glutamato em sobrenadante de astrócitos não-infectados, enquanto nenhuma alteração é notada em astrócitos infectados. Mais precisamente, vemos que em L1 essa redução é significativa em relação à concentração inicial desse neurotransmissor no meio sobrenadante em 96 h.p.i., sugerindo que as células controles mantêm sua função de captação de glutamato, ao contrário da condição ZIKV<sup>BR</sup>, enquanto isso ocorre nos dois tempos experimentais em L2. Ainda, a captação de glutamato

acontece mais intensamente na condição MOCK em 96 h.p.i. de L1, e em 48 h.p.i. de L2. Tal diversidade, novamente, pode ocorrer devido à variabilidade genética entre os dois indivíduos.

No que diz respeito à análise de expressão gênica de transportadores de glutamato, não foi possível estabelecer correlações entre estes resultados e os níveis de neurotransmissor no meio, uma vez que, de forma geral nossos resultados indicam tendência no aumento da expressão desses transportadores em células infectadas, com exceção de EAAT1 em L1. Anteriormente, Mishra e colaboradores viram, em astrócitos humanos infectados por JEV, um aumento da expressão dos transportadores de glutamato EAAT1 e EAAT2 (MISHRA; KUMAWAT; BASU, 2008). Em nossos achados, vemos que a infecção viral tende a induzir a expressão de EAAT2 em ambos os pacientes, um fenótipo que é observado em caso de astrogliose em diferentes condições patológicas (HUGHES et al., 2004).

Ainda em questão do papel de astrócitos na função sináptica neuronal, sabemos que estes são capazes de promover a sinaptogênese em neurônios via secreção de fatores de matriz extracelular, citocinas e moléculas de adesão (como revisto por FAISSNER et al., 2010). Sendo assim, a fim de avaliar se os astrócitos infectados poderiam afetar a funcionalidade de células neuronais, decidimos verificar se este evento estaria comprometido em neurônios L2 submetidos à cultura direta com astrócitos infectados deste mesmo paciente em 48 h.p.i.. Tanto quando nossos neurônios estavam em contato direto com astrócitos infectados, quanto quando em meio sobrenadante dessas células (sem vírus), percebe-se um notável déficit na atividade de sinaptogênese em ambas as situações, um fenótipo observado a nível clínico em pacientes acometidos pela SCZ (SAAD et al., 2018). A maior atividade sináptica visualizada em nossos astrócitos controles poderia estar vinculada ao fato de que estes captam mais glutamato que os infectados, uma vez que isso poderia potencializar a liberação de glutamina no meio e que o aumento da disponibilidade extracelular dessa molécula estimula a sinapse glutamatérgica neuronal (KAM; NICOLL, 2007).

Atualmente, na literatura, poucos trabalhos são encontrados quanto ao estudo dos mecanismos usados por flavivírus que poderiam causar desregulação na atividade sináptica de neurônios. No entanto, sabe-se que em situações de



neuroinflamação marcadas pela alta expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 (por exemplo, no autismo), neurônios em cocultura com astrócitos apresentam déficit de sinaptogênese (RUSSO et al., 2018). Dados preliminares do nosso grupo e os apresentados nessa dissertação mostram que, não só o vírus consegue reduzir a sinaptogênese de neurônios *in vitro* (ROSA-FERNANDES et al., 2019), mas também astrócitos infectados podem participar desse contexto, estando em contato físico com neurônios ou apenas secretando fatores no meio.

Em nossas análises, as duas linhagens nem sempre responderam de forma semelhante, como por exemplo, quanto à produção de algumas citocinas, o que está em concordância com estudos anteriores na literatura, em que a condição genética já havia sido avaliada em modelos *in vivo* infectados pelo vírus da encefalite murina. Nesta situação, camundongos C57BL/6 e SJL mostraram responder de formas diferentes à infecção, em que os astrócitos de C57BL/6 expressaram significativamente maiores concentrações de IL-6, CXCL10/IP-10, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 e CCL4/MIP-1 $\beta$  do que SJL, sugerindo contribuição dessas citocinas para a maior resistência dessa linhagem e para o *clearance* viral observado (CARPENTIER; GETTS; MILLER, 2008). Além disso, mais recentemente, NPC de gêmeos dizigóticos afetados ou não pela Síndrome Congênita do Zika (SCZ) foram analisadas quanto sua expressão gênica após infecção com ZIKV<sup>BR</sup>, cujo resultado mostrou que o *background* genético dos pacientes pode ser determinante na efetivação de mecanismos celulares de resposta ao vírus, levando à diferença de susceptibilidade entre eles (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018). Sabe-se também, por análises transcriptômicas, que a memória celular é retida mesmo após o processo de reprogramação (MARCHETTO et al., 2009), o que nos leva a crer que o histórico biológico do indivíduo poderia contribuir para divergências de respostas celulares antivirais. Mais ainda, Limonta e colaboradores também notaram variabilidade na susceptibilidade ao vírus em astrócitos fetais humanos, originados de 3 doadores diferentes (LIMONTA et al., 2018).

## 6.2 ANÁLISE DE ASTRÓCITOS DERIVADOS DE NPC INFECTADAS POR ZIKV<sup>BR</sup> (MOI 1)

Para avaliar outro âmbito da infecção por ZIKV<sup>BR</sup>, decidimos analisar se NPC infectadas seriam capazes de originar astrócitos e se o vírus conseguiria persistir durante a astrogliogênese, ainda que os processos de formação de neuroesferas e de migração celular a partir dessas sofram alterações na condição ZIKV<sup>BR</sup>.

Ainda que o diâmetro de neuroesferas ZIKV<sup>BR</sup> encontre-se reduzido em relação a MOCK (o que é condizente com dados já reportados por nosso grupo (CUGOLA et al., 2016), verificamos que astrócitos são efetivamente gerados mesmo a partir de progenitoras infectadas, expressando os marcadores GFAP e S100B. Isso está de acordo com alguns trabalhos na literatura: quando células-tronco neurais (NSC) murinas foram infectadas pelo ZIKV por Lossia e colaboradores, a expressão de genes referentes à resposta imune antiviral e à diferenciação de astrócitos era aumentada, o que poderia indicar uma tentativa de resposta celular contra o vírus pela indução da geração de astrócitos (LOSSIA et al., 2017). Ao mesmo tempo, McGrath reportou que a diferenciação neuronal de três linhagens de NSC humanas a partir de sua infecção pela linhagem mexicana do ZIKV era intensamente afetada, enquanto a maioria das células sobreviventes era composta por astrócitos (MCGRATH et al., 2017).

Além disso, o vírus persiste no espaço intra e extracelular ao final do período de diferenciação. Isso também condiz com os achados de Limonta e sua equipe, os quais indicam um longo período (30 dias) de persistência do ZIKV em astrócitos fetais humanos, o que poderia ser utilizado pelo vírus como reservatório (LIMONTA et al., 2018).

No entanto, nem todas as linhagens conseguiram sobreviver até o final dos nossos estudos: a linhagem L1 se mostrou mais frágil e não conseguiu ser submetido a alguns experimentos, o que reforça a susceptibilidade diferenciada entre as linhagens. De toda forma, a redução na migração de astrócitos gerada pela infecção por ZIKV<sup>BR</sup> infectadas pode indicar um prejuízo em um processo que é importante no cérebro em desenvolvimento, podendo assim estar relacionado à ocorrência de microcefalia.

## 7 CONCLUSÕES

- Não são observadas mudanças morfológicas, em termos de ECP, entre astrócitos infectados e astrócitos MOCK, mas nota-se que há aumento de morte celular nas primeiras 48 horas de infecção, o que tende a decrescer até o ponto de 96 h.p.i.;
- Astrócitos infectados aparentam expressar mais citocinas e quimiocinas majoritariamente pró-inflamatórias quando comparados aos astrócitos controle. No entanto, há diferenças de resposta entre os pacientes;
- Astrócitos infectados tendem a expressar mais receptores AXL e o transportador de glutamato EAAT2, porém, mais uma vez, há diferenças entre linhagens quanto a expressão gênica de receptores TAM e transportadores de glutamato;
- Astrócitos infectados demonstram prejuízo em sua função de captação de glutamato, ao contrário da condição MOCK. Quanto à sua participação no estabelecimento do fenótipo neuronal, neurônios parecem apresentar um déficit na sinaptogênese tanto quando cultivados na presença de astrócitos infectados ou apenas de seus produtos metabólicos;
- O processo de astrogliogênese infectada, por sua vez, parece ser menos afetado em L2, uma vez que há diferenciação para esse tipo celular, o que não é observado em L1. Entretanto, o ZIKV<sup>BR</sup> afeta o processo de astrogliogênese, tanto em causando diminuição do diâmetro de neuroesferas quanto na migração dessas células, o que poderiam colaborar para o desenvolvimento da microcefalia.

## REFERÊNCIAS\*

- ABBINK, P. et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. **Science**, v. 353, n. 6304, p. 1129–1132, 9 set. 2016.
- ALIMONTI, J. B. et al. Zika virus crosses an in vitro human blood brain barrier model. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 15, n. 1, p. 15, 15 dez. 2018.
- ANDERSON, C. M.; SWANSON, R. A. Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia**, v. 32, n. 1, p. 1–14, out. 2000.
- ARGAW, A. T. et al. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1977–1982, 2009.
- BECERRA-CALIXTO, A.; CARDONA-GÓMEZ, G. P. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. April, p. 1–12, 2017.
- BELL, T. M.; FIELD, E. J.; NARANG, H. K. Zika virus infection of the central nervous system of mice. **Archiv fur die gesamte Virusforschung**, v. 35, n. 2, p. 183–193, 1971.
- BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. et al. Feeder-Free Derivation of Induced Pluripotent Stem Cells From Human Immature Dental Pulp Stem Cells. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 11, p. 1707–1719, 2011.
- BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. et al. In-a-dish: induced pluripotent stem cells as a novel model for human diseases. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 83, n. 1, p. 11–17, jan. 2013.
- BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, p. 20751, 3 abr. 2014.
- BHOWMICK, S. et al. Induction of IP-10 (CXCL10) in astrocytes following Japanese encephalitis. **Neuroscience Letters**, v. 414, n. 1, p. 45–50, 2007.
- BRAHMACHARI, S. Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 18, p. 4930–4939, 2006.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil até a Semana Epidemiológica 50**. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/28/2015-boletim-microcefalia-se50-vol46-n46.pdf>>. Acesso em: 24 fev. 2019.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Situação epidemiológica da infecção pelo vírus Zika no Brasil, de 2015 a 2017**. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/12/2018-034.pdf>>.

Acesso em: 24 fev. 2019a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 45 de 2018**. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/14/2018-061.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2018b.

BULLARD-FEIBELMAN, K. M. et al. The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. **Antiviral Research**, v. 137, p. 134–140, jan. 2017.

CAIRES-JÚNIOR, L. C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 475, 2018.

CAMPBELL, I. L. et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 21, p. 10061–10065, 1993.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 9 abr. 2016.

CARPENTIER, P. A.; GETTS, M. T.; MILLER, S. D. Pro-inflammatory functions of astrocytes correlate with viral clearance and strain-dependent protection from TMEV-induced demyelinating disease. **Virology**, v. 375, n. 1, p. 24–36, 2008.

CHAI, Q. et al. Enhancement of Blood-Brain Barrier Permeability and Reduction of Tight Junction Protein Expression Are Modulated by Chemokines/Cytokines Induced by Rabies Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 88, n. 9, p. 4698–4710, 2014.

CHANG, C. Y. et al. Disruption of in vitro endothelial barrier integrity by Japanese encephalitis virus-infected astrocytes. **Glia**, v. 63, n. 11, p. 1915–1932, 2015.

CHEN, C. et al. Upregulation of RANTES Gene Expression in Neuroglia by Japanese Encephalitis Virus Infection Upregulation of RANTES Gene Expression in Neuroglia by Japanese Encephalitis Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 78, n. 22, p. 12107–12119, 2004.

CHEN, J. et al. AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. **Nature Microbiology**, 2018.

CHOI, D. W.; ROTHMAN, S. M. The Role of Glutamate Neurotoxicity in Hypoxic-Ischemic Neuronal Death. **Annual Review of Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 171–182, mar. 1990.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 1–15, 2016.

D'AIUTO, L. et al. Modeling HSV-1 infections in human CNS neuronal cells using two-dimensional and three-dimensional cultures derived from induced pluripotent stem cells. **Journal of Virology**, 20 fev. 2019.

- D'ORTENZIO, E. et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2193–2195, 2016.
- DANG, J. et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 258–265, ago. 2016.
- DE OLIVEIRA, W. K. et al. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. **The Lancet**, v. 390, n. 10097, p. 861–870, 2017.
- DEVHARE, P. et al. Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 10, p. 1–8, 2017.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus. I. Isolations and Serological Specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- DOWD, K. A. et al. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. **Science**, v. 354, n. 6309, p. 237–240, 14 out. 2016.
- EBERT, A. D. et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. **Nature**, v. 457, n. 7227, p. 277–80, 15 jan. 2009.
- FAISSNER, A. et al. Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. **Brain Research Reviews**, v. 63, n. 1–2, p. 26–38, 2010.
- FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 15 abr. 2016.
- FARINA, C.; ALOISI, F.; MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 3, p. 138–145, mar. 2007.
- FERREIRA, A. C. et al. Sofosbuvir protects Zika virus-infected mice from mortality, preventing short- and long-term sequelae. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
- FISCHER, C. et al. External Quality Assessment for Zika Virus Molecular Diagnostic Testing, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 888–892, maio 2018.
- GABRIEL, E. et al. Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids. **Cell Stem Cell**, p. 1–10, 2017.
- GARCEZ, P. P. et al. Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. **Scientific Reports**, p. 1–10, 2017.
- GARCIA, R.; MARCHETTE, N. J.; RUDNICK, A. Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia \*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 3, p. 411–415, 1 maio 1969.
- GURDON, J. B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 10, n. December, p. 622–40, dez. 1962.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 1 set. 2015.

HAMEL, R. et al. African and Asian Zika virus strains differentially induce early antiviral responses in primary human astrocytes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p. 134–137, 2017.

HASTINGS, A. K. et al. TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. **Cell Reports**, v. 19, n. 3, p. 558–568, 2017.

HUANG, Y. et al. Zika virus propagation and release in human fetal astrocytes can be suppressed by neutral sphingomyelinase-2 inhibitor GW4869. **Cell Discovery**, v. 4, n. 1, p. 19, 24 dez. 2018.

HUGHES, E. G. et al. Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking. **Molecular Brain Research**, v. 124, n. 2, p. 114–123, 2004.

HUGHES, R. A. C.; REES, J. H. Clinical and Epidemiologic Features of Guillain-Barré Syndrome. **Oxford Journals**, v. 176, n. May, p. S92–S98, 2017.

IMAIZUMI, Y. et al. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. **Molecular Brain**, v. 5, n. 1, p. 35, 2012.

JOHNSON, M. A. et al. Functional Neural Development from Human Embryonic Stem Cells: Accelerated Synaptic Activity via Astrocyte Coculture. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 12, p. 3069–3077, 21 mar. 2007.

KAM, K.; NICOLL, R. Excitatory Synaptic Transmission Persists Independently of the Glutamate Glutamine Cycle. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 34, p. 9192–9200, 2007.

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

KAMIYAMA, N. et al. Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice. **Antiviral Research**, v. 146, p. 1–11, 2017.

KANG, S.; BROWN, H. M.; HWANG, S. Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma. **Immune Network**, v. 18, n. 5, 2018.

KONDO, T. et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 4, p. 487–496, 2013.

KOZAK, R. A. et al. MicroRNA and mRNA dysregulation in astrocytes infected with Zika virus. **Viruses**, v. 9, n. 10, p. 1–18, 2017.

KUMAR, A. et al. Human sertoli cells support high levels of zika virus replication and persistence. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

LANCASTER, M. A. et al. Cerebral organoids model human brain development and

microcephaly. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 373–379, 2013.

LANCASTER, M. A.; KNOBLICH, J. A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. **Nature Protocols**, v. 9, n. 10, p. 2329–2340, 2014.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LANKO, K. et al. Replication of the Zika virus in different iPSC-derived neuronal cells and implications to assess efficacy of antivirals. **Antiviral Research**, v. 145, p. 82–86, 2017a.

LANKO, K. et al. Replication of the Zika virus in different iPSC-derived neuronal cells and implications to assess efficacy of antivirals. **Antiviral Research**, v. 145, p. 82–86, 2017b.

LAROCCA, R. A. et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, v. 536, n. 7617, p. 474–478, 25 ago. 2016.

LEMKE, G. Biology of the TAM receptors. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 11, p. 1–17, 2013.

LENTING, K. et al. Glioma: experimental models and reality. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 2, p. 263–282, 2017.

LI, C. et al. Chloroquine, a FDA-approved Drug, Prevents Zika Virus Infection and its Associated Congenital Microcephaly in Mice. **EBioMedicine**, v. 24, p. 189–194, out. 2017.

LI, F. et al. Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 89, n. 10, p. 5602–5614, 2015.

LIMONTA, D. et al. Human Fetal Astrocytes Infected with Zika Virus Exhibit Delayed Apoptosis and Resistance to Interferon: Implications for Persistence. **Viruses**, v. 10, n. 11, p. 1–19, 2018.

LOSSIA, O. V. et al. Zika virus induces astrocyte differentiation in neural stem cells. **Journal of NeuroVirology**, p. 1–10, 2017.

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

MANSUY, J. M. et al. Zika virus: High infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 405, 2016.

MARCHETTO, M. C. N. et al. Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, 2009.

MARCHETTO, M. C. N. et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. **Cell**, v. 143, n. 4, p. 527–539, 12 nov. 2010.

MARCHETTO, M. C. N.; WINNER, B.; GAGE, F. H. Pluripotent stem cells in



neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. R1, p. 71–76, 2010.

MARTINES, R. B. et al. 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. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 06, p. 159–160, 19 fev. 2016.

MCGRATH, E. L. et al. Differential Responses of Human Fetal Brain Neural Stem Cells to Zika Virus Infection. **Stem Cell Reports**, v. 8, p. 715–727, 2017.

MEERTENS, L. et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 4, p. 544–557, 2012.

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

MENESES, J. D. A. et al. Lessons Learned at the Epicenter of Brazil's Congenital Zika Epidemic: Evidence from 87 Confirmed Cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 10, p. 1302–1308, 2017.

MESCI, P. et al. Modeling neuro-immune interactions during Zika virus infection. **Human Molecular Genetics**, v. 27, n. 1, p. 41–52, 2018a.

MESCI, P. et al. Blocking Zika virus vertical transmission. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1218, 19 dez. 2018b.

MIRANDA-FILHO, D. DE B. et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. **American Journal of Public Health**, v. 106, n. 4, p. 598–600, 9 mar. 2016.

MISHRA, M. K.; KUMAWAT, K. L.; BASU, A. Japanese encephalitis virus differentially modulates the induction of multiple pro-inflammatory mediators in human astrocytoma and astrogloma cell-lines. **Cell Biology International**, v. 32, n. 12, p. 1506–1513, 2008.

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

MOTTA, I. J. F. et al. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 11, p. 1101–1103, 15 set. 2016.

MUFFAT, J. et al. Human induced pluripotent stem cell-derived glial cells and neural progenitors display divergent responses to Zika and dengue infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 27, p. 7117–7122, 3 jul. 2018.

NGUYEN, S. M. et al. Highly efficient maternal-fetal Zika virus transmission in pregnant rhesus macaques. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. 1–22, 2017.

NOWAKOWSKI, T. J. et al. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 591–596, 2016.

PALUS, M. et al. Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis

- virus. **Journal of General Virology**, v. 10, n. 2014, p. 2411–2426, 2018.
- PAPA, M. P. et al. Zika Virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, 2017.
- PETERSEN, E. et al. Rapid Spread of Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 44, n. May 2015, p. 11–15, 2016.
- RAMESH, G.; MACLEAN, A. G.; PHILIPP, M. T. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.
- RANSOHOFF, R. M.; BROWN, M. A. Innate immunity in the central nervous system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1164–1171, 2012.
- RAPONI, E. et al. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. **Glia**, v. 55, n. 2, p. 165–177, 15 jan. 2007.
- RETALLACK, H. et al. Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 50, p. 14408–14413, 2016.
- RIBEIRO, M. R. et al. Zika-virus-infected human full-term placental explants display pro-inflammatory responses and undergo apoptosis. **Archives of Virology**, v. 163, n. 10, p. 2687–2699, 2018.
- RICHARD, A. S. et al. AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 8, p. 2024–2029, 2017.
- RIDET, J. L. et al. Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 12, p. 570–577, 1997.
- ROSA-FERNANDES, L. et al. Zika Virus Impairs Neurogenesis and Synaptogenesis Pathways in Human Neural Stem Cells and Neurons. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, n. March, p. 1–16, 2019.
- RUSSO, F. B. et al. Modeling the Interplay Between Neurons and Astrocytes in Autism Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 7, p. 569–578, 2018.
- SAAD, T. et al. Neurological manifestations of congenital Zika virus infection. **Child's Nervous System**, v. 34, n. 1, p. 73–78, 10 jan. 2018.
- SACRAMENTO, C. Q. et al. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40920, 18 jan. 2017.
- SHAN, C. et al. A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.
- SHIRYAEV, S. A. et al. Repurposing of the anti-malaria drug chloroquine for Zika Virus treatment and prophylaxis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15771, 2017.

- SHUAIB, W. et al. Re-Emergence of Zika Virus: A Review on Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **American Journal of Medicine**, v. 129, n. 8, p. 879.e7-879.e12, 2016.
- SIMONIN, Y. et al. Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. **EBioMedicine**, v. 12, p. 161–169, 2016.
- SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 339–348, 1964.
- SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7–35, 2010.
- SOUZA, B. S. F. et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 39775, 2016.
- STEFANIK, M. et al. Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. **BMC Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 5, 20 dez. 2018.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 25 ago. 2006.
- TANG, H. et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 587–590, maio 2016a.
- TANG, W. W. et al. A Mouse Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral Replication. **Cell Reports**, v. 17, n. 12, p. 3091–3098, 20 dez. 2016b.
- THEEL, E. S.; HATA, D. J. Diagnostic Testing for Zika Virus: a Postoutbreak Update. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1–12, 31 jan. 2018.
- TODT, D. et al. The natural compound silvestrol inhibits hepatitis E virus (HEV) replication in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, v. 157, p. 151–158, set. 2018.
- TRICARICO, P. M. et al. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 492, n. 4, p. 597–602, out. 2017.
- UCHIL, P. D.; KUMAR, A. V. A.; SATCHIDANANDAM, V. Nuclear Localization of Flavivirus RNA Synthesis in Infected Cells. **Journal of Virology**, v. 80, n. 11, p. 5451–5464, 2006.
- VALADÃO, A. L. C.; AGUIAR, R. S.; DE ARRUDA, L. B. Interplay between Inflammation and Cellular Stress Triggered by Flaviviridae Viruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. August, p. 1–19, 25 ago. 2016.
- VAN DEN POL, A. N. et al. Zika virus targeting in the developing brain. **The Journal of Neuroscience**, p. 3124–16, 2017.
- VASUDEVAN, J. et al. Zika Virus. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 43–50, 2018.
- VENTURA, C. V. et al. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with

microcephaly. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 228, 2016.

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M. Physiology of Astroglia. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, p. 239–389, 2018.

VERMA, S.; KUMAR, M.; NERURKAR, V. R. Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks the production of West Nile virus-induced neuroinflammatory markers in astrocytes. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 3, p. 507–515, 2011.

WANG, K. et al. IP-10 Promotes Blood–Brain Barrier Damage by Inducing Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Japanese Encephalitis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. May, p. 1148, 2018.

WATANABE, M. et al. Self-Organized Cerebral Organoids with Human-Specific Features Predict Effective Drugs to Combat Zika Virus Infection. **Cell Reports**, v. 21, n. 2, p. 517–532, out. 2017.

WELLS, M. F. et al. Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 6, p. 703–708, 2016.

WU, K.-Y. et al. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. **Cell Research**, v. 26, n. 6, p. 645–654, 2016.

YU, D. X. et al. Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. **Stem Cell Reports**, v. 2, n. 3, p. 295–310, 2014.

YUAN, L. et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 933–936, 17 nov. 2017.

ZHANG, X. et al. Tick-borne encephalitis virus induces chemokine RANTES expression via activation of IRF-3 pathway. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1–18, 2016.

ZHOU, B. Y. et al. Astrocyte activation and dysfunction and neuron death by HIV-1 Tat expression in astrocytes. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 27, n. 3, p. 296–305, nov. 2004.

ZUKOR, K. et al. Zika virus-induced acute myelitis and motor deficits in adult interferon  $\alpha\beta/\gamma$  receptor knockout mice. **Journal of NeuroVirology**, p. 1–18, 2018.

\* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.