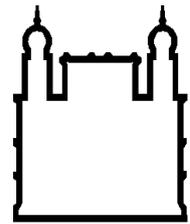




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTABELECIMENTO DE ENSAIO PARA TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO
DE DROGAS CONTRA A NEUROTOXICIDADE CAUSADA PELO ZIKA
VÍRUS**

BRUNO RAPHAEL RIBEIRO CAVALCANTE

Salvador - Bahia

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTABELECIMENTO DE ENSAIO PARA TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO
DE DROGAS CONTRA A NEUROTOXICIDADE CAUSADA PELO ZIKA
VÍRUS**

BRUNO RAPHAEL RIBEIRO CAVALCANTE

Orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Patologia Experimental
para a obtenção do Grau de Mestre.

Salvador - Bahia

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C376e Cavalcante, Bruno Raphael Ribeiro
Estabelecimento de ensaio para triagem e identificação de drogas contra a neurotoxicidade causada pelo zika vírus. / Bruno Raphael Ribeiro Cavalcante. - 2018.
85 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Milena Botelho Pereira Soares, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia.
Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

1. Zika vírus. 2. Drogas. 3. Produtos naturais. 4. Apoptose. 5. Citotoxicidade.
I. Título.

CDU 616-022.6

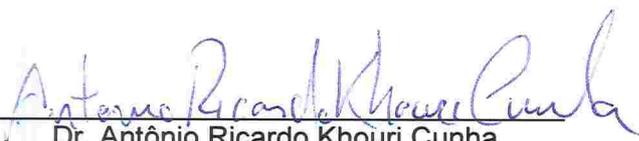
“ESTABELECIMENTO DE ENSAIO PARA TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE DROGAS CONTRA A NEUROTOXIDADE CAUSADA PELO ZIKA VÍRUS”

BRUNO RAPHAEL RIBEIRO CAVALCANTE

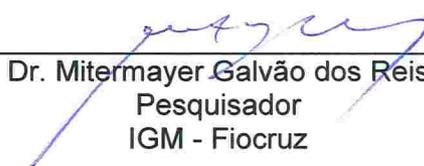
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 21 de março de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Antônio Ricardo Khouri Cunha
Pesquisador
IGM - Fiocruz



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador
IGM - Fiocruz



Dra. Milena Botelho Pereira Soares
Pesquisadora
IGM - Fiocruz

Aos meus pais, Vânia e Silva Filho, e irmã, Juliana,
pelo amor incondicional, sabedoria, compreensão
e todo o apoio imprescindível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me manter focado nos meus princípios e me dar forças quando eu parecia fraquejar;

Aos meus pais, Vânia e Silva Filho, e minha irmã, Juliana, que sempre estiveram presentes e são fundamentais em minha vida, que me ofereceram sempre o melhor que puderam me dar, dando-me apoio mesmo quando me veio o desânimo; que nos momentos difíceis sempre me dedicavam uma palavra de conforto e que, nos momentos importantes, suportaram minha ausência mesmo sem eu poder enxugar presencialmente as lágrimas de saudade;

À Dra. Milena Soares e Dr. Ricardo Ribeiro, expoentes da produção científica no Brasil, por me darem a oportunidade de desenvolver meu conhecimento científico e contribuírem de forma bastante significativa para o meu crescimento pessoal e profissional ao me exigirem reforçar meu senso de responsabilidade, comprometimento e disciplina;

A Bruno Solano, a quem devo, em grande parte, todo o meu conhecimento de bancada e ciência. Vê-lo tomar iniciativa de sentar ao meu lado na realização de experimentos provou mais uma vez que não estive diante apenas de um mentor, mas de um excelente modelo de pesquisador, de um líder-nato e, acima de tudo, de um amigo ao qual reconheço todo o potencial e que torço imensamente pelo seu sucesso no âmbito pessoal e profissional;

À Luciana Aragão, por abrir um espaço no seu coração para me auxiliar na realização de experimentos ao mesmo tempo que me permitiu entrar na rotina de sua família recém-abençoada com uma filha linda. Fiquei muito feliz de ver o quanto

amadureci ao ver que aquela professora inspiradora que tive na graduação hoje se senta ao meu lado para compartilhar nosso conhecimento científico;

Aos meus colegas do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael, pessoas com quem me sinto acolhido, sempre prestativos na realização dos experimentos, gente que levarei lembranças boas e engraçadas por toda a vida. Em especial a Gabriela Sampaio, Carolina Nonaka, Kátia Silva, Iasmim Orge, Vinícius Rocha e Tanira Bastos que contribuíram substancialmente para a concretização desse mestrado, seja no auxílio em experimentos seja pelas incontáveis horas de conversas. À Roquelina Assis por sempre me receber com alegria quando eu chegava no laboratório, tirando, carinhosamente, meu sossego;

A Gúbio Soares, Silvia Sardi e Helena da Hora, pelo imenso apoio e contribuição científica empregados na condução dos experimentos envolvendo o vírus da Zika;

À FIOCRUZ-Bahia/IGM, por oferecer todo o suporte acadêmico que tanto contribuiu para meu amadurecimento científico. À biblioteca do IGM/FIOCRUZ, pela rápida e eficiente revisão feita neste trabalho.

“Não podemos ter medo de não saber.
O que devemos recear é o não termos inquietação
para passarmos a saber.”

Mia Couto

CAVALCANTE, Bruno Raphael Ribeiro. Estabelecimento de ensaio para triagem e identificação de drogas contra a neurotoxicidade causada pelo zika vírus. 85 f. il. Dissertação em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O vírus da Zika (ZIKV), um membro pertencente ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*, chamou a atenção da população com sua rápida expansão geográfica e o aumento da patogenicidade, incluindo Síndrome de Guillain-Barré e microcefalia. Até o momento, não existe nenhuma vacina aprovada ou terapia específica para prevenir ou tratar a infecção por ZIKV. Dadas as complicações da infecção por ZIKV e os potenciais danos à saúde pública, opções de tratamento efetivas, incluindo vacinas e intervenções farmacológicas, têm se tornado o foco de Universidades e indústrias em todo o mundo. **OBJETIVO:** Realizar ensaio para triagem e identificação de drogas contra a neurotoxicidade causada pelo ZIKV em células progenitoras neurais (NPCs) humanas. **METODOLOGIA:** A triagem de drogas consistiu na avaliação do potencial antiviral de cloroquina, fingolimod (FTY720), mefloquina, tenofovir, N,N-dimetilfingosina (DMS), azidotimidina (AZT) e ácido betulínico, em 3 linhagens celulares, que incluíram células HepG2, fibroblastos dermais e NPCs humanos em uma plataforma de triagem de alto conteúdo. **RESULTADOS:** NPCs derivadas de células-tronco humanas de pluripotência induzida (iPSCs) foram geradas e caracterizadas com sucesso para testes de drogas *in vitro*. Todas as drogas avaliadas não apresentaram efeito antiviral satisfatório para a infecção com ZIKV, nem em HepG2 nem em fibroblastos, com exceção do ácido betulínico, que, embora tenha indicado modesto efeito antiviral em NPCs, acarretou menos morte celular após a infecção viral nesta linhagem. **CONCLUSÃO:** Este ensaio baseado na utilização de NPCs derivadas de iPSCs produziu resultados consistentes para a triagem de drogas quanto à avaliação de neurotoxicidade. Além disso, o ácido betulínico evidenciou um efeito citoprotetor em NPCs infectadas por ZIKV, as quais são muito suscetíveis aos efeitos da infecção viral.

Palavras-chave: Zika vírus, Triagem de drogas, Produtos naturais, Apoptose, Citotoxicidade.

CAVALCANTE, Bruno Raphael Ribeiro. Establishment of drug screening and identification of agents against zika virus-triggered neurotoxicity. 85 f. il. Dissertação em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Zika virus (ZIKV), a member of the genus *Flavivirus* and the Flaviviridae family, has drawn the population's attention with its rapid geographic expansion and increased pathogenicity, including Guillain-Barré syndrome and microcephaly. To date, there is no approved vaccine or therapy to prevent or treat ZIKV infection. Due to ZIKV infection complications and potential threat to public health, effective treatment options, including vaccines and pharmacological interventions, became the aims of Universities and industries around the world. **OBJECTIVE:** To perform an assay for drug screening to identify agents against ZIKV neurotoxicity in human neural progenitor cells. **METHODOLOGY:** The drug screening was performed in order to evaluate antiviral potential of chloroquine, fingolimod (FTY720), mefloquine, tenofovir, N,N-dimethylsphingosine (DMS), azidothymidine (AZT) and betulinic acid (BA) in 3 cell lines, including HepG2 cell line, human dermal fibroblasts and human NPCs on a high-content screening platform. **RESULTS:** human induced pluripotent stem cells (iPSCs)-derived NPCs were successfully generated and characterized for *in vitro* screening assays. All the screened drugs did not display a satisfactory antiviral effect after ZIKV infection, neither on HepG2 nor on fibroblasts, except for betulinic acid, which, although indicated a mild antiviral effect on NPCs, led to less cell death after viral infection in this cell line. **CONCLUSIONS:** The assay based on the use of iPSCs-derived NPCs presented in this work produced consistent results for drug screening for the evaluation of neurotoxicity. In addition, betulinic acid displayed a cytoprotective effect on NPCs infected by ZIKV, as they are very susceptible to the effects of viral infection.

Keywords: Zika virus, Drug screening, Natural products, Apoptosis, Cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização do genoma do ZIKV e processamento de proteínas.....	17
Figura 2. Ciclo de transmissão do vírus Zika.....	20
Figura 3. Surtos do vírus da Zika no período de 2007-2016	22
Figura 4. Tropismo celular e tecidual de ZIKV.....	26
Figura 5. Protocolo resumido para geração de células progenitoras neurais a partir de células-tronco pluripotentes induzidas.	32
Figura 6. Protocolo resumido para geração de neurônios a partir de células progenitoras neurais.....	32
Figura 7. Desenho experimental do teste de triagem de drogas.	35
Figura 8. NPCs derivadas de iPSCs humanas.....	41
Figura 9. Neurônios derivados de NPCs humanas.....	42
Figura 10. Expressão gênica de células progenitoras neurais e neurônios humanos através de qRT-PCR.....	43
Figura 11. Infecção de NPCs e neurônios humanos com ZIKV	44
Figura 12. Determinação da diferença de susceptibilidade à infecção por ZIKV em diferentes linhagens celulares.....	45
Figura 13. Triagem de drogas após 48 h de infecção por ZIKV em HepG2.....	46
Figura 14. Tratamento de fibroblastos dermais humanos infectados por ZIKV com ácido betulínico em diferentes concentrações	48
Figura 15. Tratamento de NPCs infectadas por ZIKV com ácido betulínico em diferentes concentrações	50
Figura 16. Determinação de morte celular de NPCs infectadas por ZIKV e tratadas com ácido betulínico.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Drogas selecionadas e suas correspondentes ações em flavivírus descritos na literatura.	36
Tabela 2. Oligonucleotídeos senso e antissenso utilizados nas reações de PCR.....	39
Tabela 3. Atividades antivirais e citotóxicas de drogas em linhagem HepG2.....	47
Tabela 4. Atividades antivirais e citotóxicas de ácido betulínico (AB) e cloroquina (CQ) em linhagem de fibroblastos dermais humanos.....	48
Tabela 5. Atividades antivirais e citotóxicas de ácido betulínico (AB) e cloroquina (CQ) em linhagem de NPCs.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AXL	Receptor de Tirosina Cinase AXL
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (albumina sérica bovina)
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
cDNA	DNA complementar
CGRs	Células Gliais Radiais
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i> (vírus Chikungunya)
DENV	<i>Dengue virus</i> (vírus da Dengue)
EPM	Erro padrão da média
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i> (vírus da encefalite japonesa)
HCS	<i>High-Content Screening</i> (Triagem de Alto Conteúdo)
hESC	<i>Human Embryonic Stem Cells</i> (Células-tronco Embrionárias Humanas)
iPSCs	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i> (Células-Tronco Pluripotentes Induzidas)
MDA-5	<i>Melanoma Differentiation-Associated Protein 5</i> (Proteína Associada a Diferenciação em Melanoma 5)
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NPCs	<i>Neural Progenitor Cells</i> (células progenitoras neurais)
NS1	Proteína não-estrutural 1
NS2A	Proteína Não-Estrutural 2A
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato-Salino)
PNH	Primatas Não-Humanos
PrM	Proteína de Membrana
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RIG-1	<i>Retinoic Acid Inducible Gene 1 Protein</i> (gene 1 indutível pelo ácido retinoico)
SCZ	Síndrome Congênita de Zika
SNC	Sistema nervoso central
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
TBEV	<i>Tick-Borne Encephalitis Virus</i> (Virus da Encefalite do Carrapato)
TCID ₅₀	<i>Tissue Culture Infectious Dose</i> (dose infectante em cultura de tecido 50%)
TLR-3	<i>Toll-like Receptor 3</i> (receptor de Toll-like 3)
UFBA	Universidade Federal da Bahia
WNV	<i>West Nile virus</i> (vírus do oeste do Nilo)
YFV	<i>Yellow Fever virus</i> (vírus da febre amarela)
ZIKV	Vírus da Zika

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus celsius
%	porcentagem
g	gravidade
h	hora
L	litro
μL	microlitro
μM	micromolar
μm	micrômetro
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> (multiplicidade de infecção)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	ZIKA VÍRUS: BIOLOGIA E FILOGENIA	16
1.2	MANIFESTAÇÃO CLÍNICA E DIAGNÓSTICO	17
1.3	FORMAS DE TRANSMISSÃO	19
1.4	EPIDEMIOLOGIA	21
1.5	EMERGÊNCIA GLOBAL	23
1.6	PATOLOGIA E TROPISMO DO ZIKV	24
1.7	MODELOS EXPERIMENTAIS	26
1.8	TRIAGEM DE NOVOS FÁRMACOS	28
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	31
4.2	CULTURA DE CÉLULAS HEPG2	31
4.3	CULTURA DE FIBROBLASTOS HUMANOS	31
4.4	CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS E DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS PROGENITORAS NEURAI	31
4.5	DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAI EM NEURÔNIOS	32
4.6	CULTURA E EXPANSÃO DE ZIKV	33
4.7	TITULAÇÃO DE ZIKV	33
4.8	INFECÇÕES COM ZIKV	33
4.9	DROGAS TESTADAS	34
4.10	ATIVIDADE ANTI-ZIKV <i>IN VITRO</i>	34
4.11	AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE	34
4.12	ANÁLISES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	37
4.13	ANÁLISE DE IMAGENS NO SISTEMA <i>HIGH-CONTENT SCREENING</i> (OPERETTA)	37
4.14	AVALIAÇÃO DE NEUROTOXICIDADE	38
4.15	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR	38

4.16	TESTE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CASPASE	39
4.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5	RESULTADOS	41
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS E NEURÔNIOS	41
5.2	ESTABELECIMENTO DE INFECÇÃO COM ZIKV EM NPC E NEURÔNIOS	44
5.3	DETERMINAÇÃO DA DIFERENÇA DE SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO POR ZIKV EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES	45
5.4	TRIAGEM INICIAL DE DROGAS COM POTENCIAL ANTIVIRAL EM LINHAGEM CELULAR HEPG2	46
5.5	AVALIAÇÃO DE EFEITO ANTIVIRAL DO ÁCIDO BETULÍNICO EM FIBROBLASTOS DERMAIS HUMANOS.....	47
5.6	AVALIAÇÃO DE EFEITO ANTIVIRAL DO ÁCIDO BETULÍNICO EM NPCS.....	49
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 ZIKA VÍRUS: BIOLOGIA E FILOGENIA

As infecções virais têm sido uma causa de doenças graves para os seres humanos, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, levando a um enorme custo econômico e social. Neste sentido, recentemente o vírus da Zika (ZIKV) chamou a atenção da população quando um grande surto ocorrido no Brasil no primeiro semestre de 2015 se espalhou rapidamente para outros países da região e emergiu como motivo de preocupação mundial.

O ZIKV é um arbovírus de RNA de cadeia simples e sentido positivo pertencente ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*, a qual possui outros membros que causam ampla morbidade em todo o mundo (HUANG et al., 2014), tais como o vírus da dengue (DENV), o vírus do Nilo Ocidental (WNV), o vírus da febre amarela (YFV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV) (SONG et al., 2017). O genoma do ZIKV é traduzido em uma poliproteína longa no citoplasma de células infectadas, a qual é clivada e processada por proteases hospedeiras ou virais em três proteínas estruturais - proteína de membrana (prM), proteína do envelope (E) e proteína do capsídeo (C) - e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) em uma fase posterior. As proteínas estruturais formam a partícula viral, ao passo que as proteínas não-estruturais desempenham funções na replicação do genoma, processamento de poliproteínas e manipulação de respostas do hospedeiro para vantagem viral (SHI e GAO, 2017; Figura 1).

De acordo com análises genômicas e filogenéticas comparativas, existem várias cepas homólogas de ZIKV, incluindo: (I) a linhagem africana (ZIKV em Uganda), (II) a linhagem asiática, que emergiu recentemente no Pacífico (com origem no Senegal) e (III) a linhagem sul-americana (no Brasil) (UNNI et al., 2011; LAZEAR et al., 2016; FAYE et al., 2014). Estes genomas, juntamente com alguns existentes, foram usados em um estudo para construir árvores filogenéticas do ZIKV nas Américas. De acordo com este trabalho, a propagação do ZIKV seguiu um rastro de mutações - das acumuladas por cepas de vírus de amostras recentes em diferentes momentos e lugares até um antepassado comum do surto (WOROBNEY, 2017). Estas árvores confirmam evidências anteriores de que o Nordeste do Brasil foi o centro da

epidemia e corrobora com análises filogenéticas anteriores que apontaram que a epidemia do ZIKV foi causada pela introdução de uma linhagem de genótipo asiático nas Américas aproximadamente no final de 2013, pelo menos um ano antes da sua detecção (FARIA et al., 2017).

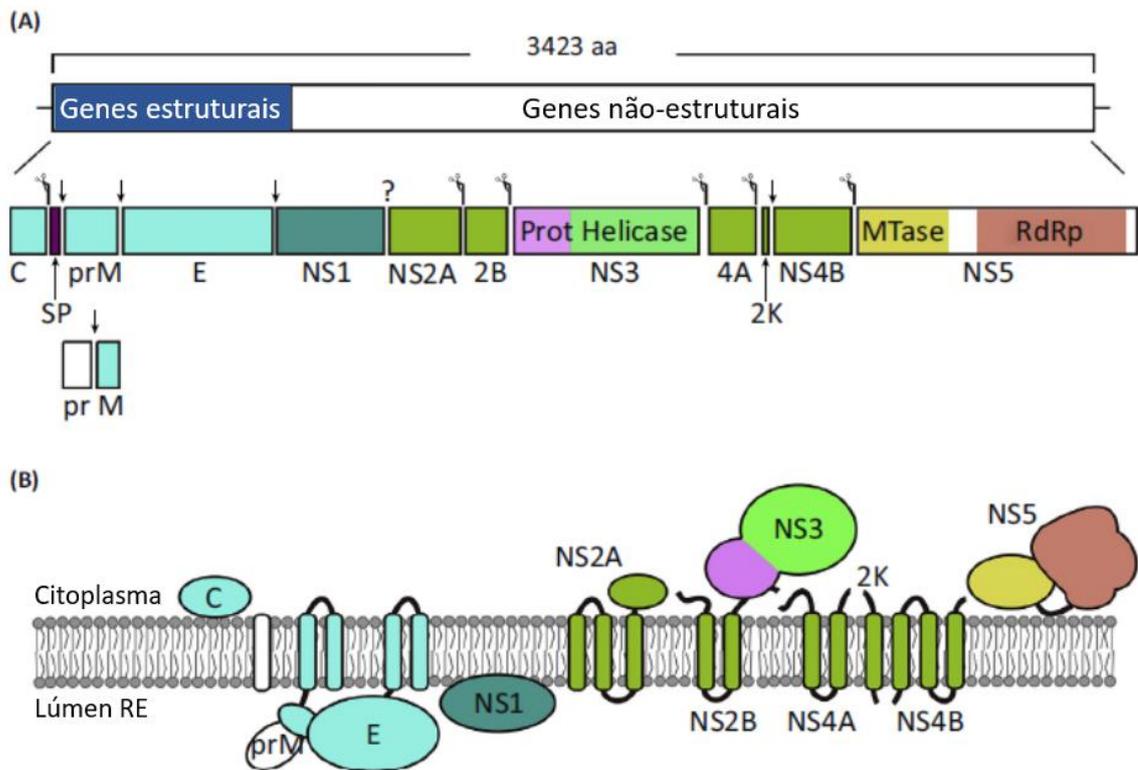


Figura 1. Organização do genoma do ZIKV e processamento de proteínas. **(A)** Processamento de poliproteína e clivagem de produtos. **(B)** Topologia da poliproteína na membrana. FONTE: Adaptado de SHI e GAO, 2017.

1.2 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA E DIAGNÓSTICO

A principal forma de transmissão do vírus para humanos envolve a infecção por mosquitos infectados do gênero *Aedes*. Após o repasto sanguíneo, as manifestações clínicas variam de casos assintomáticos a uma síndrome gripal associada à febre, cefaleia, mal-estar e erupção cutânea (HAMER et al., 2017). Aproximadamente cerca de 80% dos indivíduos infectados com o ZIKV permanece assintomático e o restante geralmente desenvolve em estado febril com duração de 4-7 dias associado à erupção maculopapular, artralgia, conjuntivite, comichão, mialgia e dor de cabeça (LADHANI

et al., 2016; MUSSO e GUBLER, 2016). Em comparação com outros flavivírus encefalíticos, tais como WNV e TBEV (vírus da encefalite do carrapato), o ZIKV geralmente é menos neuroinvasivo em adultos e raramente causa meningite e encefalite (CARTEAUX et al., 2016)

Em alguns locais, o aparecimento do ZIKV coincidiu com áreas de DENV e CHIKV (vírus da Chikungunya) bem estabelecidas, tornando a doença mal diagnosticada (FERNANDA-ESTOFOLETE et al., 2016). O diagnóstico laboratorial de infecção aguda por ZIKV depende atualmente da detecção de RNA de ZIKV em fluidos biológicos, incluindo soro, plasma, urina, saliva e líquido amniótico. A capacidade da técnica de RT-PCR para detecção de RNA de ZIKV no sangue é limitada, uma vez que a viremia de ZIKV geralmente é baixa e limitada ao terceiro e quarto dias após o início da doença (WAGGONER e PINSKY, 2016; LANCIOTTI et al., 2008). No entanto, durante o surto ocorrido na Polinésia Francesa, muitos pacientes apresentaram manifestações clínicas graves, incluindo Síndrome de Guillain-Barré (SGB), que exigiu hospitalização e intervenções médicas.

Inicialmente considerado como discreta, a infecção revelou uma potente capacidade de danificar tecidos neurológicos em desenvolvimento baseada na crescente evidência da sua relação com mulheres grávidas e o aumento da incidência de gestações anormais e anormalidades congênitas no recém-nascido. A gama completa destas manifestações congênitas continua a ser determinada, contudo, um padrão típico de características clínicas e achados de imagens de crianças afetadas emergiu, levando ao termo Síndrome Congênita de Zika (SCZ), que reúne aspectos clínicos resultantes do dano neurológico direto e perda de volume intracraniano grave, tais como microcefalia; desproporção craniofacial e *cutis gyrata*; hipertonicidade e hiperreflexia; convulsões; irritabilidade; achados neurorradiológicos anormais; disfagia e outras dificuldades de alimentação; anormalidades oculares; e perda de audição sensorial (SHIRLEY e NATARO, 2017; VENTURA et al., 2017; MOORE et al., 2017). Embora sejam necessários mais estudos para definir os efeitos da idade gestacional sobre a patogênese do ZIKV durante a gravidez, dados epidemiológicos sugerem que a infecção durante o primeiro e segundo trimestres em seres humanos está correlacionada com os casos mais graves da doença (PACHECO et al., 2016).

1.3 FORMAS DE TRANSMISSÃO

O ciclo natural de transmissão envolve principalmente vetores do gênero *Aedes* (*A. furcifer*, *A. taylori*, *A. luteocephalus* e *A. africanus*) e macacos (DICK et al., 1952; FAYE et al., 2014), enquanto que os seres humanos constituem hospedeiros ocasionais. O mosquito adquire o vírus durante o repasto sanguíneo; após a absorção, o vírus se replica e é transmitido para um reservatório animal durante o repasto sanguíneo das fêmeas do mosquito. Antes que a atual pandemia começasse em 2007, o vírus da Zika existia em um ciclo de transmissão enzoótico/silvestre envolvendo primatas não-humanos (PNH) e espécies de mosquitos *Aedes* na floresta, onde eventualmente ocorreriam infecções esporádicas em humanos. Em ambientes urbanos e suburbanos, o vírus passou a ser transmitido em um ciclo de transmissão humano-mosquito-humano (PETERSEN et al., 2016; Figura 2). Duas espécies no subgênero *stegomyia* de *Aedes* - *A. aegypti* e, em menor medida, *A. albopictus* - são as únicas espécies conhecidas de *Aedes* nas Américas e foram associadas a quase todos os surtos conhecidos do ZIKV, embora outras duas espécies, *A. hensilli* e *A. polynesiensis*, consistiram nos principais vetores nas ilhas Yap (LEDERMANN et al., 2014) e na Polinésia Francesa (MUSSO et al., 2014).

O *A. aegypti* possui alta capacidade vetorial (isto é, a capacidade geral de uma espécie de vetor na transmissão de um patógeno em um determinado local e em um momento específico) como pode ser relatado em trabalhos recentes que indicam que o mosquito consegue transmitir ZIKV, DENV e CHIKV na mesma picada (RÜCKERT et al., 2017). Junta-se a isto o fato de o *A. aegypti* se alimentar, principalmente de sangue de seres humanos, possuir picada quase imperceptível e viver em estreita relação com a presença humana (PETERSEN et al., 2016).

O ZIKV, além da transmissão vetorial, pode também ser passado de mãe para filho durante a gravidez (OLIVEIRA-MELO et al., 2016; BERSNARD et al., 2014) ou durante a amamentação (COLT et al., 2017); através de contato sexual (MUSSO et al., 2015) ou até mesmo através de mordida de animal (LEUNG et al. 2015), de exposição no laboratório (SIMPSON, 1964; FILIPE et al., 1973), de transfusão de sangue (AUBRY et al., 2015) e até do contato com secreções, incluindo lágrimas (PETERSEN et al., 2016; FOY et al., 2017; MANSUY et al., 2016; MINER et al., 2016). Desta forma, os vários modos de transmissão do ZIKV tornam difícil o desenvolvimento de estratégias de controle contra o patógeno (SONG et al., 2017).

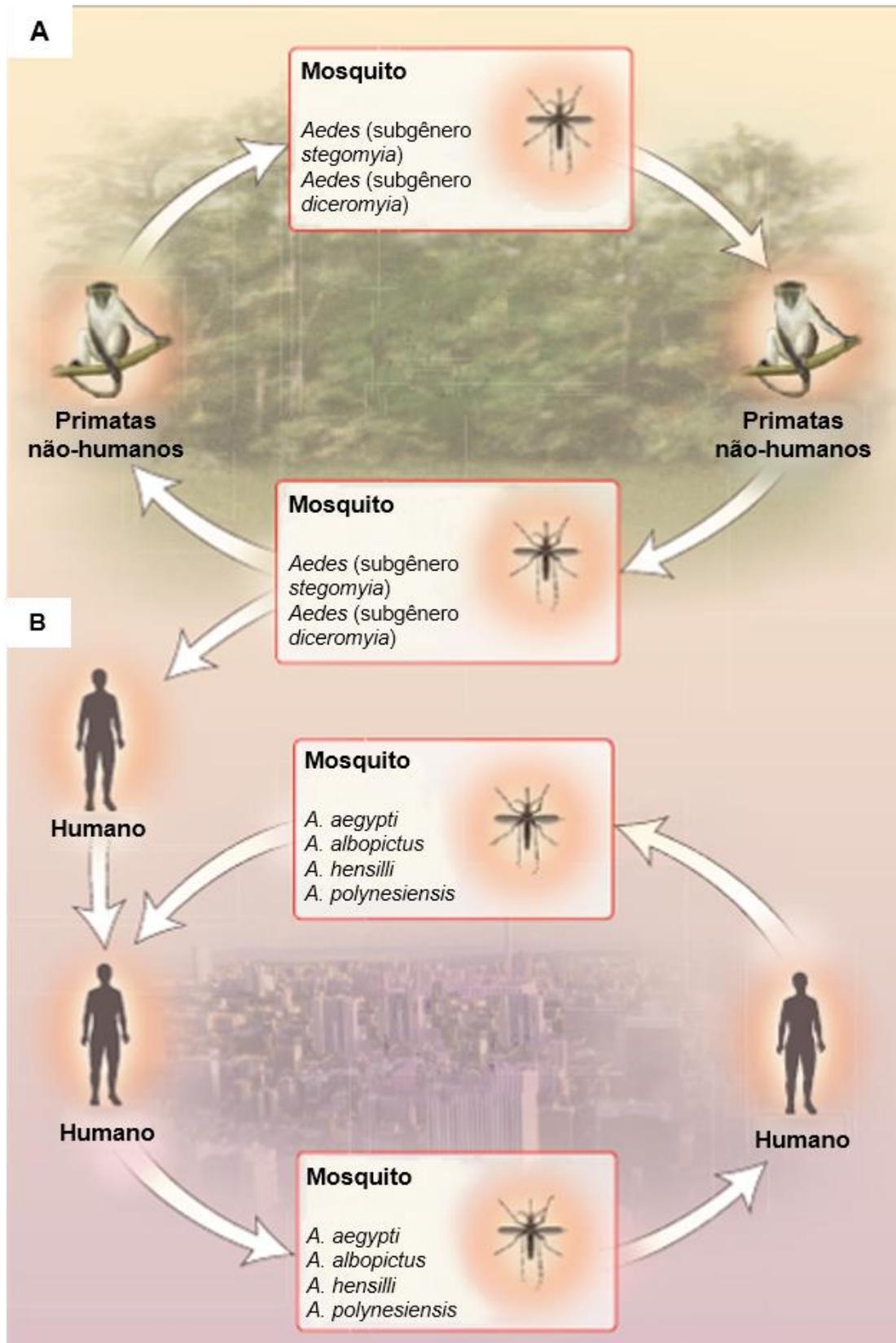


Figura 2. Ciclo de transmissão do vírus Zika. (A) ciclo de transmissão enzoótico/silvestre entre primatas não-humanos e certas espécies de mosquitos *Aedes* em florestas. (B) ciclo de transmissão humano-mosquito-humano em ambiente suburbano e urbano, principalmente envolvendo mosquitos de *A. aegypti*. FONTE: Adaptado de PETERSEN et al., 2016.

1.4 EPIDEMIOLOGIA

O ZIKV foi inicialmente isolado do sangue de macaco *rhesus* sentinela na Floresta de Zika (Uganda) em 1947 (DICK et al., 1952), e apenas em 1952 foi identificado em seres humanos (HAYES, 2009). Após a sua descoberta inicial, o ZIKV ficou confinado durante 60 anos a uma zona equatorial em toda a África e Ásia. Fora dessa zona, entretanto, emergiu primeiramente uma epidemia nas ilhas Yap, um dos quatro Estados que fazem parte do arquipélago da Micronésia, no Oceano Pacífico. Pesquisadores americanos e polinésios identificaram 131 casos suspeitos, dos quais 49 foram confirmados e uma estimativa de infecção pelo ZIKV em 73% dos habitantes (DUFFY et al., 2009; LANCIOTTI et al., 2008). Espalhou-se, então, para o leste da Polinésia Francesa e outras ilhas do Pacífico em 2013-2014, as quais enfrentaram uma epidemia de dengue quando as autoridades de saúde notaram a existência de casos de Zika, com estimativas entre 8.500 e 19.000 casos suspeitos de infecção (CAO-LORMEAU et al., 2014; ROTH et al., 2014). Até a epidemia na Polinésia Francesa, não havia relatos de quadros graves causados pelo ZIKV e nenhuma morte foi relatada. Não se sabe como o vírus chegou à Polinésia Francesa, mas se espalhou para outras ilhas do Pacífico, tais como as Ilhas Cook, Ilha de Páscoa, Vanuatu, Ilhas Salomão e Nova Caledônia. Casos importados da Polinésia Francesa também foram diagnosticados no Japão, na Noruega e na França (SONG et al., 2017).

A epidemia de ZIKV atingiu a América Latina em 2015 a partir do Brasil, quando os primeiros casos de infecção pelo vírus ocorreram na cidade de Camaçari, região metropolitana de Salvador (BA). Os exames dos pacientes foram enviados para a Universidade Federal da Bahia (UFBA), onde foram submetidos à análise de virologistas que constataram a presença do vírus e comprovaram sua transmissão pelo vetor (CAMPOS et al., 2015). Uma das hipóteses em estudo é que o ZIKV pode ter sido introduzido no país durante a Copa das Confederações de 2013, que ocorreu no Brasil entre 15 e 30 de junho daquele ano. O evento teve a participação do Taiti, que fica na Polinésia Francesa, região que foi afetada pelo vírus naquela época (FARIA et al., 2016). O ZIKV se espalhou então para as Américas nos meses seguintes, surgindo nos EUA em 2016, onde causou um pequeno surto na Flórida e casos autóctones no Texas (SONG et al., 2017; FARIA et al., 2017; BAUD et al., 2017; Figura 3).

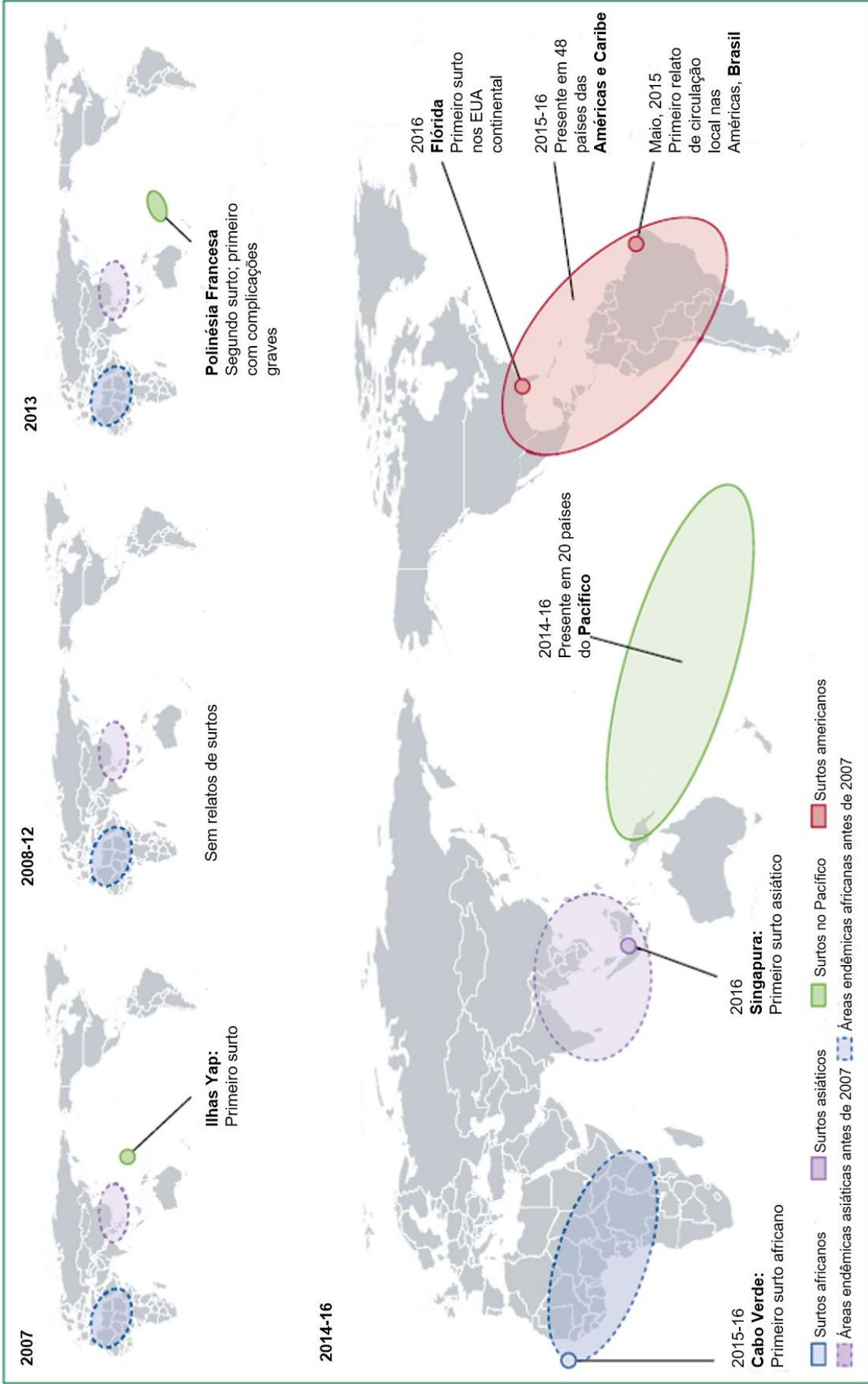


Figura 3. Surtos de vírus da Zika no período de 2007-2016. Distribuição geográfica da presença de casos reportados de vírus da Zika no mundo. FONTE: Adaptado de BAUD et al., 2017.

A infecção do ZIKV humano parece ter mudado de personagem ao expandir sua faixa geográfica. A mudança foi de uma infecção endêmica e transmitida por mosquito causando doença leve na África equatorial e Ásia, tornando-se uma infecção que acarretou, a partir de 2007, grandes surtos e, que a partir de 2013, apresentou epidemias relacionadas a distúrbios neurológicos, incluindo síndrome de Guillain-Barré e microcefalia, em toda a região do Pacífico e as Américas.

1.5 EMERGÊNCIA GLOBAL

Embora a infecção pelo ZIKV tenha sido considerada uma doença emergente, foi negligenciada durante muitos anos, desde que a infecção humana foi relatada inicialmente. Até o início da epidemia em 2007, esse vírus não era considerado uma ameaça para a saúde humana, pois a infecção era considerada modesta e benigna. Entretanto, tudo mudou quando o ZIKV foi detectado no Brasil em maio de 2015 e um número crescente de bebês nascidos com microcefalia e adultos com síndrome de Guillain-Barré foi relatado (DO ROSÁRIO et al., 2016), principalmente no Nordeste do Brasil, o epicentro do surto mais recente. Em termos numéricos, o Brasil apresentou o maior número de casos notificados de ZIKV em todo o mundo, com mais de 200.000 casos reportados no fim de 2016 (BRASIL, 2017; FARIA et al., 2017).

Ainda não está claro o que transformou um vírus relativamente benigno em uma ameaça de abrangência mundial. Alguns autores apontam que a resposta possa estar em uma mutação (S139N) sofrida no gene que codifica uma proteína estrutural do vírus PrM, ocorrida em 2013, e que pode levar à microcefalia fetal. Esta hipótese foi levantada após a comparação de isolados do ZIKV de epidemias da América do Sul entre 2015 e 2016, que causavam microcefalia, com um vírus que circulou no Camboja, na Ásia, em 2010, que não causava microcefalia (YUAN et al., 2017). Já outros estudos sugerem que a resposta imunológica a anticorpos anti-flavivírus heterólogos de infecções pré-existentes possa estar envolvida nas complicações associadas à infecção por ZIKV (RUSSEL, 2016).

Neste período, a crescente disseminação do ZIKV em todo o mundo e a falta de conhecimento básico sobre a biologia do vírus contribuíram para que a Organização Mundial da Saúde (OMS) finalmente considerasse as implicações alarmantes atribuídas ao vírus, declarando a infecção por ZIKV uma emergência de saúde pública de interesse internacional, uma vez que a infecção continuou a se

espalhar para o resto da Américas do Sul e Central e Caribe (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

1.6 PATOLOGIA E TROPISMO DO ZIKV

Os flavivírus infectam preferencialmente células e tecidos específicos e o tropismo tecidual determina a patologia de casos graves associados a transmissões virais humano-humano (BOLDESCU et al., 2017). Embora informações sobre a patogênese sejam escassas, já é sabido que o ZIKV se replica em fibroblastos dérmicos humanos, queratinócitos epidérmicos e células dendríticas imaturas. O receptor AXL possui um papel importante para a entrada viral nessas células. A infecção viral induz a transcrição do receptor Toll-like 3 e vários genes estimulados por interferon (HAMEL et al., 2015). Também foi observada que a formação de autofagossomos está associada ao aumento da replicação viral e à indução de expressão de antígenos antivirais (RIG-1, MDA-5 e TLR3), que são capazes de detectar a presença de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) observados após a infecção de fibroblastos dermais. Além disto, a infecção por ZIKV induziu um programa autofágico confirmado pela presença de vesículas características semelhantes a autofagossomos em fibroblastos infectados (HAMEL et al., 2015).

A provável causa de microcefalia e outras lesões do neurodesenvolvimento pode ser explicada pelo fato de o ZIKV preferencialmente infectar células progenitoras neurais (NPCs, do inglês *neural progenitor cells*) (TANG et al., 2016). Como demonstrado em estudos anteriores, o ZIKV tem a capacidade de infectar estas células, resultando em alterações na expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular, indução da apoptose e comprometimento da produção de novos neurônios (LI et al., 2016a, SOUZA et al., 2016). A proliferação e a autorrenovação das NPCs, bem como a sua diferenciação, migração neuronal e maturação, são essenciais para o desenvolvimento embrionário normal do cérebro de mamíferos (LI et al., 2016b). Dessa forma, a função do circuito neural pode ser drasticamente afetada pelas variações no número de células neurais que são produzidas durante o desenvolvimento, quer sejam causados por doenças ou por infecções. Assim, a incapacidade de produzir novos neurônios, por sua vez, pode levar à microcefalia fetal.

Analogamente, a infecção de culturas de organoides de neuroesferas humanas *in vitro* com o ZIKV comprometeu seu crescimento e levou a um aumento da morte celular (GARCEZ et al., 2016). A infecção direta de NPCs pode não ser o único fator que contribui para a microcefalia induzida por ZIKV. A infecção de células da crista neural craniana pode resultar na produção de citocinas inflamatórias que agem de forma parácrina causando a eliminação das NPCs ao promover o processo de apoptose (BAYLESS et al., 2016).

O mecanismo através do qual o ZIKV interage com a maquinaria molecular do hospedeiro e compromete a neurogênese *in vivo* ainda não está bem elucidado, mas alguns autores sugerem que a expressão da proteína NS2A do ZIKV (mas não a proteína NS2A de DENV), diminui a proliferação, causa a diferenciação prematura de células gliais radiais (CGRs) e favorece o posicionamento anormal de neurônios recém-nascidos. Isto ocorre através de interações entre os componentes de NS2A com os complexos de junções de adesão (JA), que permitem a aderência célula-célula, como evidenciado no córtex embrionário de camundongos, cujas alterações resultaram em formações aberrantes dessas junções e de suportes (*scaffolds*) de fibras gliais radiais. De forma similar, reduziu a proliferação de CGRs e levou ao déficit de junções de adesão em organoides de prosencéfalo humano (YOON et al., 2017).

Além disso, estudos em humanos e em modelo animal demonstraram que a infecção pelo ZIKV pode resultar na persistência de vírus infecciosos e ácido nucleico viral em vários fluidos corporais (por exemplo, sêmen, saliva, lágrimas e urina) e órgãos-alvo, incluindo os locais imunoprivilegiados (por exemplo, olhos, cérebro e testículos) e o trato genital feminino (HIRSCH et al., 2017; MINER e DIAMOND, 2017; Figura 4).

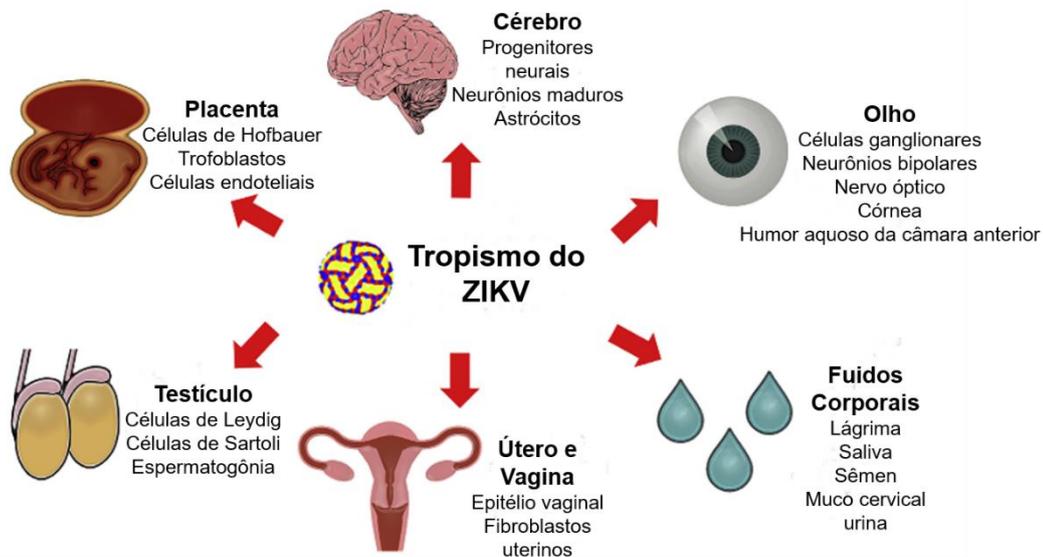


Figura 4. Tropismo celular e tecidual de ZIKV. Estudos em humanos e em modelos animais (camundongos e primatas não-humanos) detectaram a presença de ZIKV no cérebro, olho, fluidos corporais, útero e vagina, testículo e placenta. FONTE: Adaptado de MINER e DIAMOND, 2017.

1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS

Após a mais recente epidemia de ZIKV, vários modelos animais foram estudados visando mimetizar a infecção viral, o tropismo e a patogênese da doença. Estes sistemas, desenvolvidos em camundongos, primatas não-humanos e em outras espécies, foram utilizados para abordar uma série de questões que são críticas para a compreensão da epidemia e incluem uma melhor definição da dinâmica viral e persistência, a avaliação de vacinas candidatas e ferramentas de diagnóstico, a avaliação de riscos neurológicos e a caracterização de várias vias de transmissão (KUBLIN e WHITNEY, 2017).

Embora os modelos animais utilizados visassem reproduzir os aspectos da infecção, estes possuem limitações que devem ser consideradas para a correta interpretação de resultados experimentais. Ao se utilizar camundongos, verifica-se que (I) a placenta é estruturalmente e imunologicamente distinta da de seres humanos, podendo requerer viremia materna mais elevada; (II) o ZIKV não é naturalmente adaptado para se replicar em camundongos imunocompetentes, provavelmente devido à ausência de mecanismos de evasão do sistema imunológico

espécie-específicos; e (III) algumas manifestações da doença associadas à infecção pelo ZIKV em seres humanos não foram observadas em camundongos, como a síndrome de Guillain-Barré. Em relação a estudos com primatas não-humanos, as limitações incluem (I) o custo elevado; (II) diferenças no período gestacional (maior que em camundongos), o que prolonga o tempo de experiências e análises; e (III) número limitado de instalações que lidem e tenham experiência com PNH (MORRISON e DIAMOND, 2017).

Estudos experimentais em distúrbios do desenvolvimento neural têm sido tradicionalmente complicados devido à dificuldade na obtenção de células neuronais humanas que possam ser cultivadas e amplificadas *in vitro*. Neste contexto, as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) foram descritas há uma década e se tornaram uma ferramenta poderosa na modelagem *in vitro* de doenças, descoberta de drogas e intervenções terapêuticas uma vez que elas proporcionam uma fonte potencialmente ilimitada de células diferenciadas de indivíduos saudáveis ou com doenças específicas (TAKAHASHI et al., 2007; KAHLER et al., 2013).

As iPSCs humanas podem ser submetidas a condições específicas de cultura que induzem a diferenciação neuronal e recapitulam vários aspectos da diferenciação e maturação que ocorrem no desenvolvimento normal do embrião. Uma importante população neuronal é a das células progenitoras neurais, ou comumente chamadas de NPCs, as quais são células multipotentes que podem ser cultivadas como aglomerados não-aderentes (neuroesferas) sob condições definidas por longos períodos de tempo. A análise clonal das NPCs demonstra a sua capacidade de se autorrenovar e se diferenciar nos principais tipos celulares no sistema nervoso central (SNC): em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (CARPENTER et al., 1999). Além disso, apresentam NESTINA, SOX2 e PAX6 como marcadores de sua identidade enquanto progenitoras (SUZUKI et al., 2010; HUTTON e PEVNY, 2011; OSUMI et al., 2008). No cérebro embrionário, a migração das NPCs é necessária para o desenvolvimento normal do cérebro, e uma falta de migração provoca danos cerebrais graves e letalidade (HAMANOUE et al., 2016). Uma vez infectadas pelo ZIKV, as células progenitoras neurais derivadas de iPSCs apresentam os efeitos citopáticos característicos da infecção, tais como desregulação de vias relacionadas ao ciclo celular e aumento da morte celular (DANG et al., 2016). Desta forma, estas células tornaram-se uma boa plataforma *in vitro* para testes de triagem de drogas para provável avaliação de neuroproteção ou atividade antiviral.

1.8 TRIAGEM DE NOVOS FÁRMACOS

A primeira linha de defesa contra o ZIKV consiste em impedir as picadas do mosquito usando repelentes ou pesticidas. Entretanto, estes métodos não conseguiram conter epidemias de arbovírus recentes. Até o momento, não existe uma vacina aprovada ou terapia específica para prevenir ou tratar a infecção por ZIKV. Tampouco há terapias para evitar danos no feto após a infecção por ZIKV durante a gravidez ou para evitar resultados graves causados pelo vírus (BARROWS et al., 2016).

O processo de desenvolvimento de medicamentos requer um grande esforço, é de alto risco, dispendioso e longo. Embora as especificidades e a duração do processo de desenvolvimento de medicamentos possam ser bastante variáveis, em geral, a aprovação de um novo medicamento desde o início leva mais de dez anos (WILLMANN et al., 2008). Na seleção e estabelecimento do alvo para doenças, é importante avaliar diferentes abordagens de descoberta de drogas, de modo a permitir finalmente o uso clínico do medicamento. Neste sentido, o reposicionamento de drogas é uma alternativa estratégica para a descoberta de novas aplicações, uma vez que os compostos já liberados para uso em humanos apresentam dados sobre sua toxicidade, estudos pré-clínicos e clínicos, além de efeitos colaterais conhecidos e interação cruzadas identificadas (ASHBURN e THOR, 2004).

Ainda não há opções de tratamento específicas para a infecção com o ZIKV, mas muitos pesquisadores estão engajados em desenvolver fármacos antivirais e vacinas. Uma estratégia importante inclui a triagem de alto conteúdo (HCS; do inglês, *High Content Screening*), a qual consiste na aplicação de microscopia automatizada e análise de imagem tanto para descoberta de medicamentos quanto para biologia celular. Esta técnica tem sido considerada particularmente promissora devido à sua capacidade de estudar simultaneamente vários parâmetros em sistemas biológicos complexos (ZOCK, 2009). As aplicações mais óbvias do HCS envolvem testes com moléculas que podem ser otimizadas em drogas candidatas para atividades celulares que não podem ser facilmente medidas por um único desfecho final, como proteínas espacialmente localizadas ou medidas de morfologia celular. Como a HCS fornece mais do que apenas o desfecho final, os efeitos fora do alvo, como citotoxicidade ou fluorescência dos compostos de teste, são facilmente identificados (BUCHSER et al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A rápida expansão na distribuição geográfica e o aumento da patogenicidade observados pela primeira vez no surto brasileiro em 2015-2016 apontaram para uma evolução molecular do ZIKV que levou a Organização Mundial de Saúde a declarar uma emergência de saúde pública de preocupação internacional. Dadas as complicações da infecção por ZIKV e os potenciais danos à saúde pública, opções de tratamento efetivas, incluindo vacinas e intervenções farmacológicas, têm se tornado o foco de Universidades e indústrias em todo o mundo, embora ainda não haja nenhuma vacina aprovada ou terapia específica para prevenir ou tratar a infecção por ZIKV.

Apesar das várias iniciativas visando enfrentar a situação de emergência epidemiológica e os esforços para o avanço do conhecimento sobre a biologia do ZIKV, a transmissão e patogênese da doença e a resposta do hospedeiro à infecção, há necessidades urgentes, incluindo o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico sorológicos, bem como o desenvolvimento de moléculas neutralizantes e agentes anti-ZIKV. Desta forma, nesse projeto visamos estabelecer um ensaio para a triagem de drogas com atividade anti-ZIKV em células progenitoras neurais humanas. A hipótese deste trabalho é que as drogas selecionadas podem prevenir a morte de células progenitoras neurais infectadas pelo ZIKV.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um ensaio para triagem e identificação de drogas contra a neurotoxicidade causada pelo vírus da Zika em células progenitoras neurais humanas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Gerar células progenitoras neurais humanas derivadas de iPSCs;
- Caracterizar a linhagem de células progenitoras neurais humanas obtida;
- Comparar a infecção de ZIKV em diferentes tipos celulares;
- Avaliar a citotoxicidade apresentada por drogas a serem triadas;
- Realizar triagem de uma seleção de drogas para identificação de agentes com ação antiviral e neuroprotetora.

4 METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a geração de células-tronco pluripotentes induzidas, o Comitê de Ética do Hospital São Rafael aprovou o procedimento envolvendo a coleta de células e amostras humanas (número de aprovação 19883113.0.0000.0048). Os participantes leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido do estudo.

4.2 CULTURA DE CÉLULAS HEPG2

As células da linhagem HepG2 foram descongeladas e expandidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 2 mM de L-glutamina e penicilina/estreptomicina (todos da ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em frascos de cultura de células e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

4.3 CULTURA DE FIBROBLASTOS HUMANOS

Os fibroblastos humanos foram previamente isolados de um doador saudável por biópsia cutânea sob aprovação do Comitê de Ética. As células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SBF, 2 mM de L-glutamina e penicilina/estreptomicina (todos da ThermoFisher Scientific) em frascos de cultura de células e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

4.4 CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS E DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIAS

As iPSCs geradas previamente através de reprogramação de fibroblastos da pele usando vetores episomais (OKITA et al., 2011), foram mantidas em meio Essential 8 (ThermoFisher Scientific) e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A indução de diferenciação neural foi realizada a partir de culturas em monocamada de iPSCs distribuídas em placas de 6 poços previamente cobertas com Matrigel (Corning, Nova Iorque, EUA) na densidade de 2.5×10^5 células/cm², às quais foram adicionadas meio de indução neural STEMdiff (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) de

acordo com as instruções do fabricante. O protocolo simplificado está ilustrado na figura 5. As NPCs geradas foram mantidas em meio de cultura de progenitores neurais StemDiff (todos da StemCell Technologies).

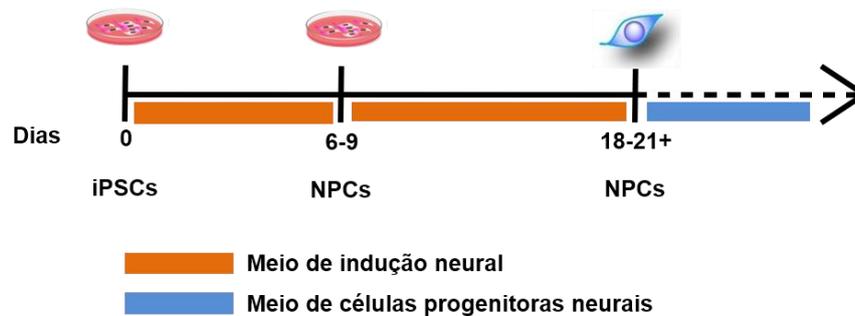


Figura 5. Protocolo resumido para geração de células progenitoras neurais (NPCs) a partir de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). Utilização de meio de indução neural (em vermelho) e de manutenção de NPCs (em azul).

4.5 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS EM NEURÔNIOS

A indução de diferenciação neuronal foi realizada a partir de culturas em monocamada de NPCs distribuídas em placas de 24 poços previamente cobertas com Matrigel (Corning) na densidade de 5×10^4 células/cm², às quais foram adicionadas meio de diferenciação neuronal STEMDiff (Stem Cell Technologies) por 7 dias de cultura e meio de maturação neuronal por 4 semanas subsequentes de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo simplificado está ilustrado na figura 6.

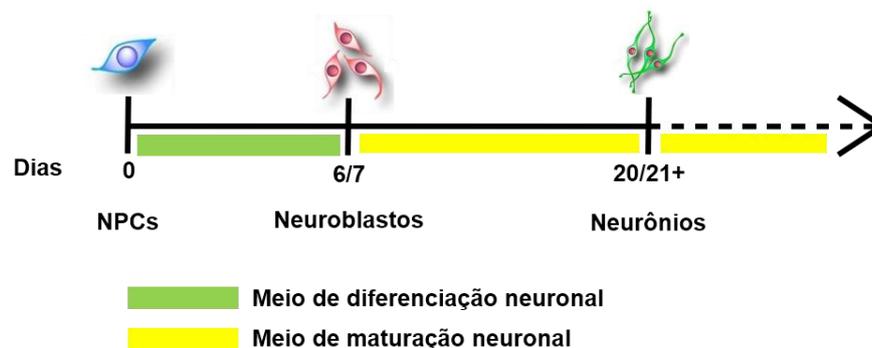


Figura 6. Protocolo resumido para geração de neurônios a partir de células progenitoras neurais (NPCs). Utilização de meio de diferenciação neuronal (em verde) e de maturação de neurônios (em amarelo).

4.6 CULTURA E EXPANSÃO DE ZIKV

A cultura do ZIKV (GenkBank KU940228), isolado a partir do soro de um paciente portador do vírus no estado da Bahia, Brasil (CAMPOS et al., 2015), foi mantida em células da linhagem C6/36 originadas do mosquito *Aedes albopictus*, as quais são importantes para a replicação de espécies do gênero Flavivirus. Estas células foram cultivadas a 28°C e 0% CO₂ em meio Leibovitz L15 (ThermoFisher Scientific), suplementado com 5% de soro bovino fetal (ThermoFisher Scientific) e 10% de caldo fosfato triptose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

4.7 TITULAÇÃO DE ZIKV

Células VERO foram distribuídas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 células/poço, 24h antes da infecção com vírus. Após a formação de monocamada de células, os vírus foram descongelados e uma diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8}) foi realizada em 10 replicatas para cada diluição.

Foram colocados 50 µL de cada diluição nos respectivos poços e as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para promover a adsorção e penetração viral no tempo de 60-90 min. Após este período, foram adicionados 50 µL de meio DMEM a 2% SBF em cada poço, e novamente as células foram incubadas por 5 dias para observação de efeitos citopáticos, os quais foram quantificados para determinação do título viral de acordo com o método de Reed e Muench (REED e MUENCH, 1938). A titulação de vírus infecciosos obtida a partir da cultura de células VERO produziu um valor de 10^6 TCID₅₀/mL.

4.8 INFECÇÕES COM ZIKV

A infecção por ZIKV foi realizada em células HepG2, fibroblastos e NPCs, em placas de 96 poços (densidade de 10^4 células/poço) ou placas de 6 poços (densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poço) previamente cobertas com Matrigel (apenas para as NPCs) e incubadas por 24 h. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado e as células foram incubadas com ZIKV diluído para a multiplicidade de infecção (MOI) de 1. As células foram levadas à estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 90 min, para a adsorção e penetração

do ZIKV, com posterior adição de meio de progenitores neurais por 48 h, com ou sem tratamento farmacológico.

4.9 DROGAS TESTADAS

Para a realização deste trabalho, as drogas utilizadas estão listadas a seguir: ácido betulínico, o qual foi extraído da casca de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae), usando um método previamente descrito (BARBOSA-FILHO et al., 1985); sal difosfato de cloroquina (Sigma-Aldrich), FTY720 (Sigma-Aldrich), N,N-dimethyl sfingosine (Sigma-Aldrich) mefloquina (Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos, RJ, Brasil), tenofovir (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE, PE, Brasil) e azidotimidina (LAFEPE). Todas as drogas selecionadas já apresentam ações contra flavivírus reportadas e descritas na literatura (Tabela 1).

4.10 ATIVIDADE ANTI-ZIKV *IN VITRO*

O ensaio de triagem de drogas com atividade antiviral foi inicialmente padronizado em células da linhagem HepG2 (Figura 7A), e posteriormente em fibroblastos e nas NPCs (Figura 7B). Após a infecção com ZIKV, as células receberam o meio de cultura correspondente acrescido com uma das drogas de interesse, com o objetivo de determinar a concentração que inibe em 50% a replicação viral (IC_{50}) ou a viabilidade celular (CC_{50}). Os valores de IC_{50} e CC_{50} foram determinados baseados na porcentagem de inibição de infecção viral e viabilidade celular do controle negativo, ou seja, sem adição de droga. Em todos os experimentos, cinco diferentes concentrações das drogas foram consideradas. O cálculo de regressão não linear para a obtenção dos valores de IC_{50} e CC_{50} foi efetuado a partir do programa Prism 6 GraphPad (GraphPad Software). A droga de referência utilizada como controle positivo foi a cloroquina (DELVECHIO et al., 2016).

4.11 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

A determinação da concentração letal para 50% da população celular (CC_{50}) foi realizada através do ensaio de Alamar Blue® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA),

seguindo as recomendações do fabricante. Células das linhagens HepG2, fibroblastos dermais e NPCs foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços na densidade de 10^4 células/poço e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 por 24h. Posteriormente, as drogas foram adicionadas em diferentes concentrações e as placas incubadas por 48h. Após este período de incubação, os poços foram lavados com solução salina e, em seguida, foi adicionado o reagente AlamarBlue® (Invitrogen) na concentração de 10%. As células foram incubadas por mais 18 h e, em seguida, foram realizadas as leituras colorimétricas da placa de 96 poços com os comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O cálculo para a obtenção do valor de CC_{50} foi efetuado utilizando a regressão não linear no programa Prism 6 GraphPad (GraphPad Software).

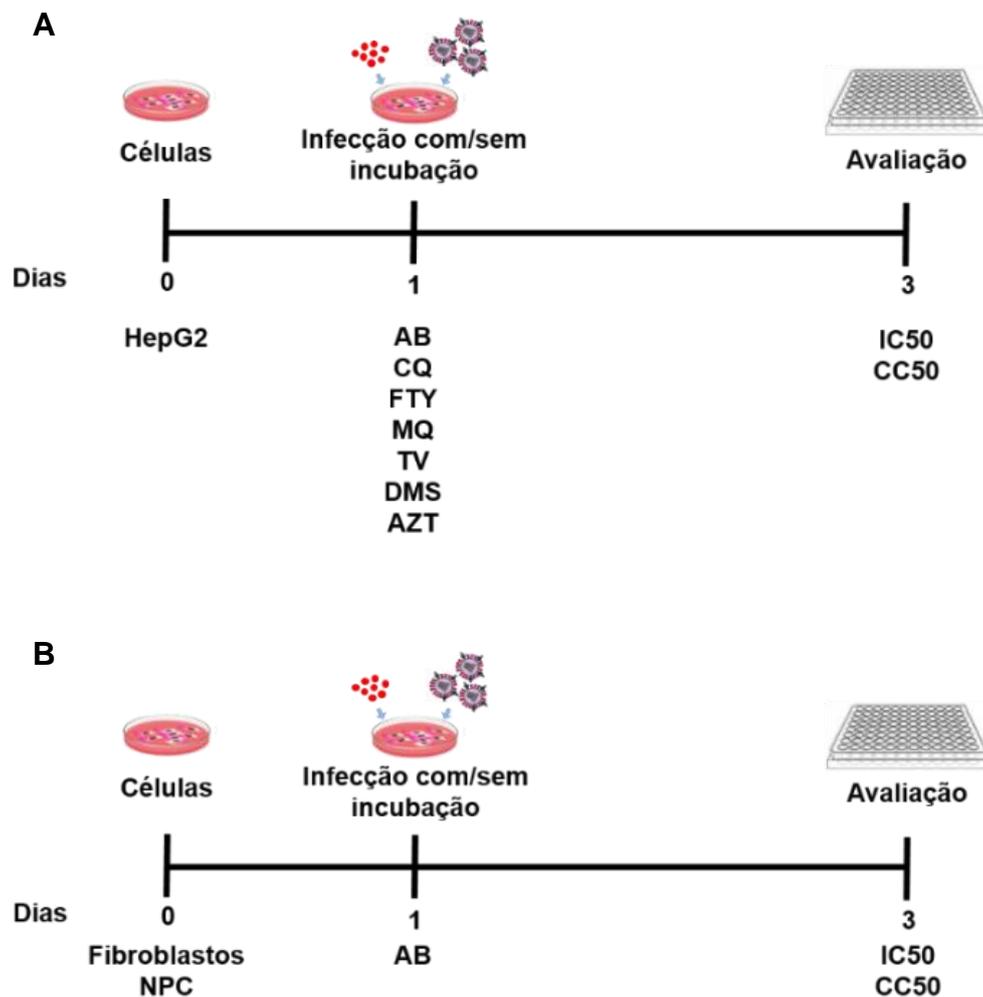


Figura 7. Desenho experimental do teste de triagem de drogas em **(A)** linhagem HepG2 e **(B)** fibroblastos dermais e NPCs humanos. AB: ácido betulínico; CQ: cloroquina; FTY: fingolimod (FTY720); MQ: mefloquina; TV: tenofovir; DMS: N,N-dimetilesfingosina; AZT: azidotimidina.

Tabela 1. Drogas selecionadas e suas correspondentes ações em flavivirus descritos na literatura.

Droga	Classe/Categoria	Aprovado pelo FDA?	Virus testado	Modelos celulares	Características/mecanismo de ação	Referência
Ácido betulinico	Triptenoide pentacíclico	Não	HCV	Células Ava5	Atividade antiviral em HCV via supressão de COX2 mediada por MAPK-ERK1/2 e NF-κB	LIN et al., 2015
Azidotimidina	Antiviral	Sim	DENV WNV	Células BHK	Inibe infecção por DENV e WNV (mecanismo desconhecido).	VERNEKAR et al., 2015
Cloroquina	Agente bloqueador de endocitose	Sim	ZIKV	Células Vero Células endoteliais microvasculares de cérebro humano Células-tronco neurais Neuroesferas	Antimalárico. inibe a produção de vírus e morte celular promovida por infecção por ZIKV sem efeitos citotóxicos. A cloroquina reverteu parcialmente as alterações morfológicas induzidas pela infecção por ZIKV em neuroesferas de camundongos	DELVECCHIO et al., 2016
DMS	Inibidor de esfingosina cinase	Não	DENV	Células Vero	Aumenta as ceramidas celulares através da via de salvamento	CAROCCI et al., 2015
FTY720	Imunomodulador	Sim	HCV	Células Huh7-Lunet	Modulador de receptor de esfingosina-1-fosfato	CIESEK et al., 2008
Mefloquina	Antiparasítico (antimalárico)	Sim	ZIKV	Células JEG3 Células HeLa Células Huh7 Células HAEC	Disruptura de autofagia, possivelmente promove alterações no pH lisossomal. Risco durante a gravidez sob investigação.	GENG et al., 2010; POOLE e OHKUMA, 1981; BARROWS et al., 2016
Tenofovir	Antiviral	Sim	DENV	Células A549	Provável inibidor de nucleosídeo.	CHEN et al., 2010

DMS: N,N-dimetilelesfingosina; HCV: vírus da hepatite C; DENV: vírus da dengue; WNV: vírus do oeste do Nilo; ZIKV: vírus da zika.

4.12 ANÁLISES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células HepG2, fibroblastos e NPCs foram fixadas com 4% de paraformaldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) durante 15 min, permeabilizadas com 0,1% de Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos e bloqueadas com 5% de albumina sérica bovina (BSA/PBS) (Sigma-Aldrich) por 1 h. Após o período de incubação, foram adicionados os seguintes anticorpos primários diluídos em 1% BSA: anti-caspase 3 clivada (1:200, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), anti-DCX,(1: 300, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), anti-Nestina (1: 200; Millipore, Billerica, MA, EUA), anti-Sox2 (1: 500, Cell Signaling Technology).

Para a marcação do ZIKV, foi utilizado o anticorpo monoclonal primário criado contra a proteína E de Flavivirus (MIAF, obtido de WRECVA, diluído 1: 1000), gentilmente fornecido pelo Dr. Nikos Vasilakis (University of Texas Medical Branch). Todos os anticorpos foram incubados durante a noite a 4°C. Os seguintes anticorpos secundários foram usados (diluídos 1:1000): anti-camundongo IgG Alexa Fluor 488 ou 568, anti-coelho IgG Alexa Fluor 568, anti-cabra IgG Alexa Fluor 488, anti-camundongo IgG Alexa Fluor 488, anti-humano IgG Alexa Fluor 488 (todos ThermoFisher Scientific). As lamínulas foram submetidas a lavagens sucessivas com Triton X-100 e PBS. A coloração nuclear foi realizada com DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As imagens foram capturadas no microscópio confocal A1+ (Nikon, Tóquio, Japão) ou no microscópio confocal FluoView 1000 (Olimpo, Tóquio, Japão).

4.13 ANÁLISE DE IMAGENS NO SISTEMA *HIGH-CONTENT SCREENING* (OPERETTA)

As amostras marcadas foram submetidas a análise de imagens utilizando o Operetta *High Content Screening System* (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) e o Software Harmony 3.5.2 (Perkin Elmer). Foram fotografados nove campos por poço para segmentação e identificação da célula hospedeira e quantificação da infecção. A segmentação celular foi realizada através de algoritmos do software Harmony. Primeiramente o núcleo foi detectado como objetos no canal Hoechst33342 com área

menor a $30 \mu\text{m}^2$ e contraste menor do que 0,05. A partir da detecção nuclear foi realizada a segmentação do citoplasma no canal do Hoechst33342.

As células infectadas foram selecionadas com base na mediana da intensidade de fluorescência do Alexa Fluor 488, localizados no citoplasma da célula (mediana >100). Com base na análise das imagens utilizando estes parâmetros, foi quantificado o número de células infectadas por poço. A atividade de cada molécula testada foi determinada com base no número de células infectadas (X) relativas a um controle não tratado e infectado (Y), conforme a equação abaixo. Um controle de células não infectadas foi utilizado para normalizar a intensidade de fluorescência.

$$\% \text{ redução da infecção} = \left(\frac{X \text{ teste}}{Y \text{ controle}} \times 100 \right) - 100$$

4.14 AVALIAÇÃO DE NEUROTOXICIDADE

A neurotoxicidade foi avaliada no sistema *High-Content Screening* (Operetta) através da contagem do número de NPCs previamente marcadas com Hoechst33342 (ThermoFisher Scientific), um marcador nuclear, após serem infectadas com ZIKV seguidas por tratamento com droga selecionada e incubada por 48 h. Utilizando Software Harmony 3.5.2 (Perkin Elmer), inicialmente, o núcleo foi detectado como objetos no canal Hoechst33342 com área menor a $30 \mu\text{m}^2$ e contraste menor do que 0,05. Com base na análise das imagens utilizando estes parâmetros, foi quantificado o número de células infectadas por poço.

4.15 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR

Fibroblastos e NPCs humanos foram cultivados e distribuídos em placas de 6 poços na densidade de 3×10^5 células de cada grupo por poço, controle e infectado com ZIKV. O meio de cultura foi aspirado de 3 poços (triplicatas biológicas) e as células foram lavadas com 1 mL de PBS gelado e centrifugados a 350 xg por 5 min à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* utilizado para a extração de RNA.

O RNA total foi extraído com TRIzol® (ThermoFisher Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante. Os *pellets* de RNA foram ressuspensos em 10 μl de água livre

de RNase e armazenados a -80°C . Para a síntese de DNA complementar (cDNA), utilizou-se 1 μg de RNA por amostra no *kit* de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (ThermoFisher Scientific), seguindo recomendações do fabricante. Para quantificar a expressão dos genes SOX2, PAX6, MAP2, TUJ1, Olig2, GFAP, foram utilizados 60 ng de molde de cDNA; 5 μL de Taqman *Master Mix* 2x (ThermoFisher Scientific) e 0,5 μL de sondas na concentração 20x, totalizando um volume final de 10 μL (todos de ThermoFisher Scientific). Todas as reações foram executadas em triplicata em termociclador ABI7500 (ThermoFisher Scientific) sob condições de ciclagem térmica padrão. Os valores médios de Ct (limite de ciclo) foram utilizados para calcular a expressão do gene alvo, e normalizados com genes *housekeeping* (GUSB, hs99999908m1, HPRT hs99999909m1; GAPDH, hs99999905m1). Todos os experimentos foram realizados em condições livres de DNase/RNase. A análise dos resultados foi feita através do método de $2^{-\Delta\text{Ct}}$ (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008). Os gráficos foram gerados através do GraphPad versão 6. Sequências iniciais usadas em análises de PCR em tempo real estão descritas na tabela 2. A amplificação do gene AXL foi obtida através de sonda Taqman (hs01064444m1).

Tabela 2. Oligonucleotídeos senso e antissenso utilizados nas reações de PCR.

Primer	Sequência Senso	Sequência Antissenso
GFAP	5'TCAACTCACCGCCAACAG-3'	5'-CATCTGCTTCCTGTCTATAGGC-3'
PAX6	5'-GCCCTCACAAACACCTACAG-3'	5'-TCATAACTCCGCCCATTCAC-3'
MAP2	5'-CTTCAGCTTGTCTCTAACCGAG-3'	5'-CTGCAACTATTCAAGGAAGTGG-3'
SOX2	5'-CACACTGCCCTCTCAC-3'	5'-TCCATGCTGTTTCTTACTCTCC-3'
TUJ1	5'-TTTGGACATCTCTTCAGGCC-3'	5'-TTTCACACTCCTTCCGCAC-3'
OLIG2	5'-AGCTCCTCAAATCGCATCC-3'	5'-AAAAGGTCATCGGGCTCTG-3'

4.16 TESTE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CASPASE

As NPCs foram distribuídas em placas de 96 poços na densidade de 10^4 células/poço e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 . Após 24h de incubação, a infecção com ZIKV na MOI de 1 foi realizada, seguida por tratamento com ácido betulínico nas concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50 μM e incubadas em estufa por 48 h. A atividade

enzimática das caspases 3/7 foi medida com o *kit* de ensaio Caspase-Glo, de acordo com as instruções do fabricante (Promega, Madison, WI, EUA). Resumidamente, foram adicionados 100 µL de reagente Caspase-Glo a cada poço, e a placa foi levada ao agitador de placas a 100 rpm e incubados à temperatura ambiente durante 90 min. A luminescência de cada amostra foi medida em um luminômetro Glomax 20/20 (Promega).

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística do experimento de validação de infecção de HepG2, fibroblastos e NPCs foi realizada utilizando o programa Prism 6 GraphPad (GraphPadSoftware), utilizando os testes de regressão não-linear, One-Way ANOVA, Two-Way ANOVA e teste *t* não pareado bicaudal e quando necessário, o pós-teste de Newman-Keuls, sendo considerados estatisticamente significantes aqueles com valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS E NEURÔNIOS

Para a geração das NPCs, as células-tronco pluripotentes induzidas foram inicialmente levadas à diferenciação neural. As células obtidas apresentaram crescimento em agregados celulares quando cultivados em monocamada, cujo aspecto morfológico está de acordo com o cultivo desta linhagem (Figura 8A). Em seguida, quando caracterizadas por imunofluorescência, apresentaram marcação positiva para os marcadores de superfície nestina, e nuclear, Sox2 (Figura 8B), dois marcadores de populações de progenitores neurais em todo o SNC em desenvolvimento e adulto, e necessários para manter sua identidade de progenitoras (SUZUKI et al., 2010; HUTTON e PEVNY, 2011).

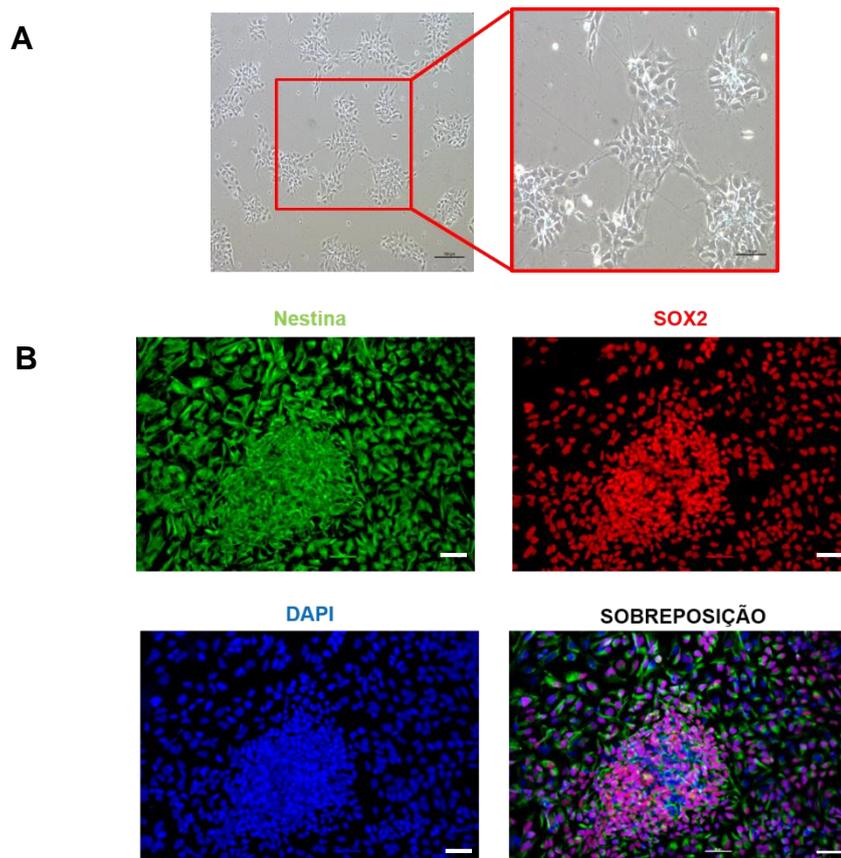


Figura 8. NPCs derivadas de iPSCs humanas. **(A)** Cultura de NPCs observada por microscopia de contraste de fase após a diferenciação de IPSC humanas. **(B)** Imagens de microscopia confocal de culturas de NPCs marcadas com NESTINA (verde), SOX2 (vermelho) e DAPI (azul). Escala das barras = 100 μ m.

Outra maneira de promover a caracterização de NPCs consiste em avaliar sua capacidade de se diferenciar em algum fenótipo neuronal. Desta forma, induzimos as NPCs para o processo de diferenciação em neurônios. Os neurônios gerados apresentaram aspectos morfológicos típicos deste tipo celular, que envolvem poucos aglomerados celulares, proliferação extensa de neuritos e ramificação (Figura 9A), além de marcarem positivamente para as proteínas MAP2, DCX e TUJ1 (Figura 9B), todos marcadores de diferenciação neuronal (SOLTANI et al., 2005; GLEESON et al., 1999; MERBERG e HALL, 1995).

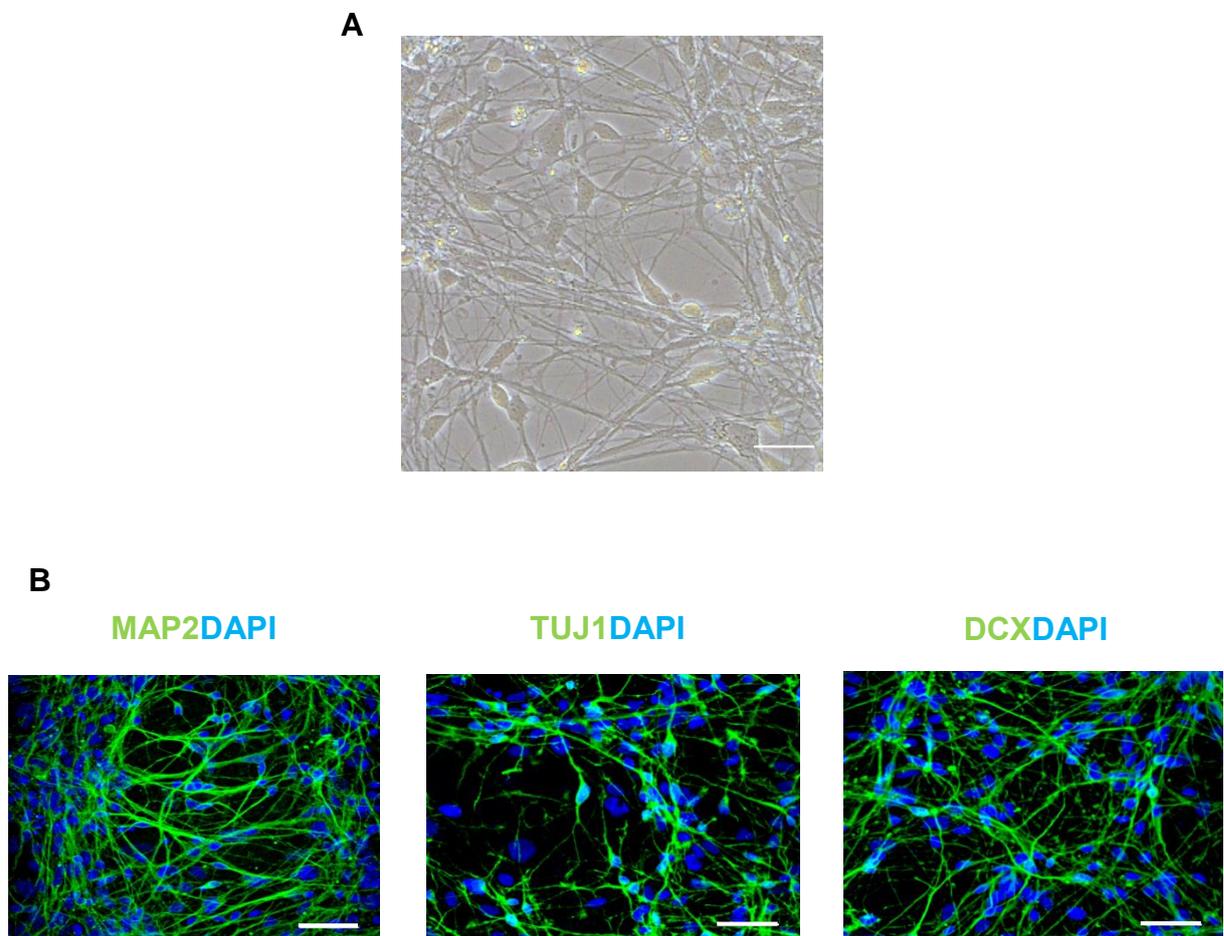


Figura 9. Neurônios derivados de NPCs humanas. **(A)** Cultura de neurônios observada por microscopia de contraste de fase de neurônios humanas após diferenciação neuronal. **(B)** Imagens de microscopia confocal de culturas de neurônios humanos marcados com MAP2, TUJ1, DCX (em verde) e DAPI (azul). Escala das barras em (A) = 50 μm , em (B) = 100 μm .

Ambas culturas, de NPCs e de neurônios, foram avaliadas quanto ao perfil de expressão de genes importantes em seus processos de diferenciação (Figura 10). As NPCs indicaram a expressão de DCX, SOX2 e PAX6 (Figura 10A), além de marcadores do comprometimento neuronal TUJ1 e MAP2, estes últimos sendo mais expressos em neurônios (Figura 10B). Nenhuma amplificação foi detectada quando analisamos genes característicos de diferenciação em oligodendrócitos (OLIG2) ou astrócitos (GFAP) (dados não representados).

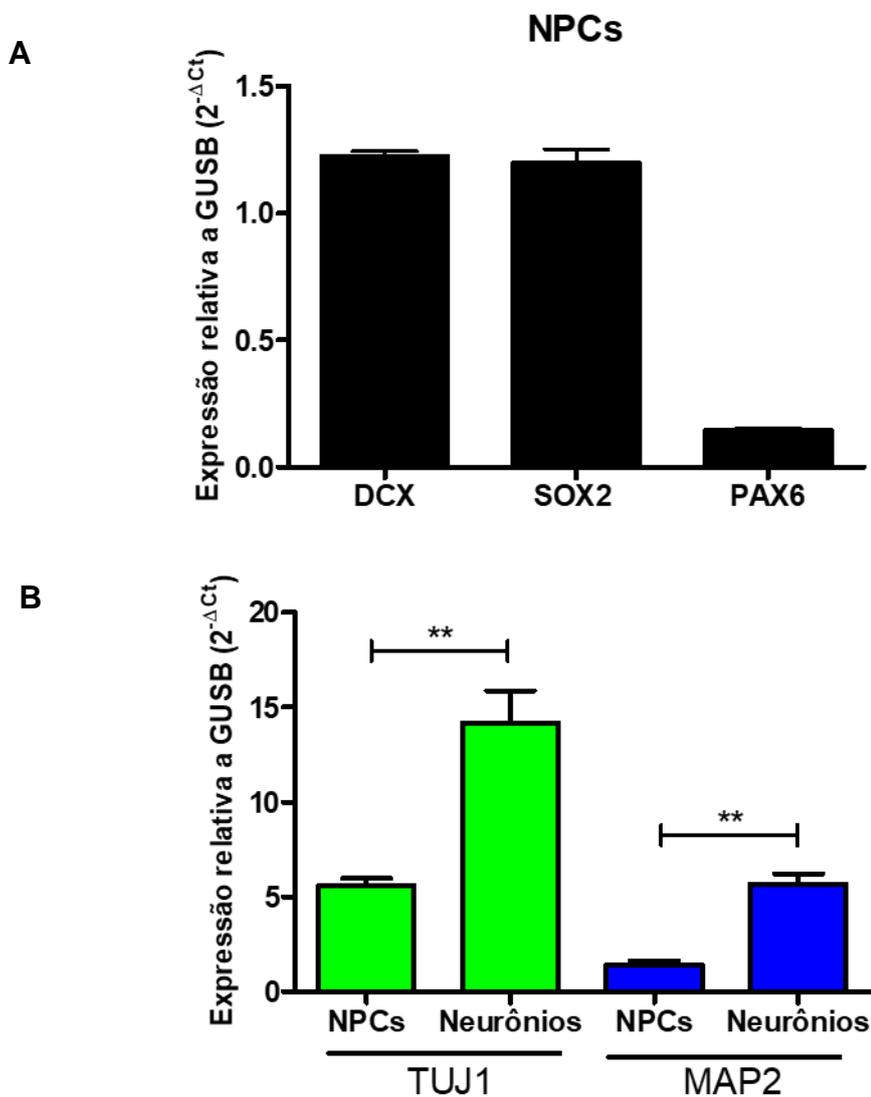


Figura 10. Expressão gênica de células progenitoras neurais e neurônios humanos através de qRT-PCR. **(A)** Expressão gênica de DCX, SOX2 e PAX6, todos marcadores de NPCs; e **(B)** de neurônios, TUJ1 e MAP2. Normalizados com o endógeno GUSB. Valores representam a média \pm EPM de 3 repetições em triplicata. **p<0,005.

5.2 ESTABELECIMENTO DE INFECÇÃO COM ZIKV EM NPC E NEURÔNIOS

As NPCs e os neurônios foram infectados com o ZIKV para verificar a diferença de suscetibilidade destas linhagens celulares após a infecção viral. As imagens ilustradas no painel de imunofluorescência demonstram maior infecção em NPCs quando comparadas com suas contrapartes neuronais (Figura 11A), como pôde ser verificado após a quantificação da infecção pelo ZIKV após 48 h (Figura 11B). Quando a expressão do receptor AXL é considerada, observa-se que há um aumento deste em NPCs em relação aos neurônios (Figura 11C).

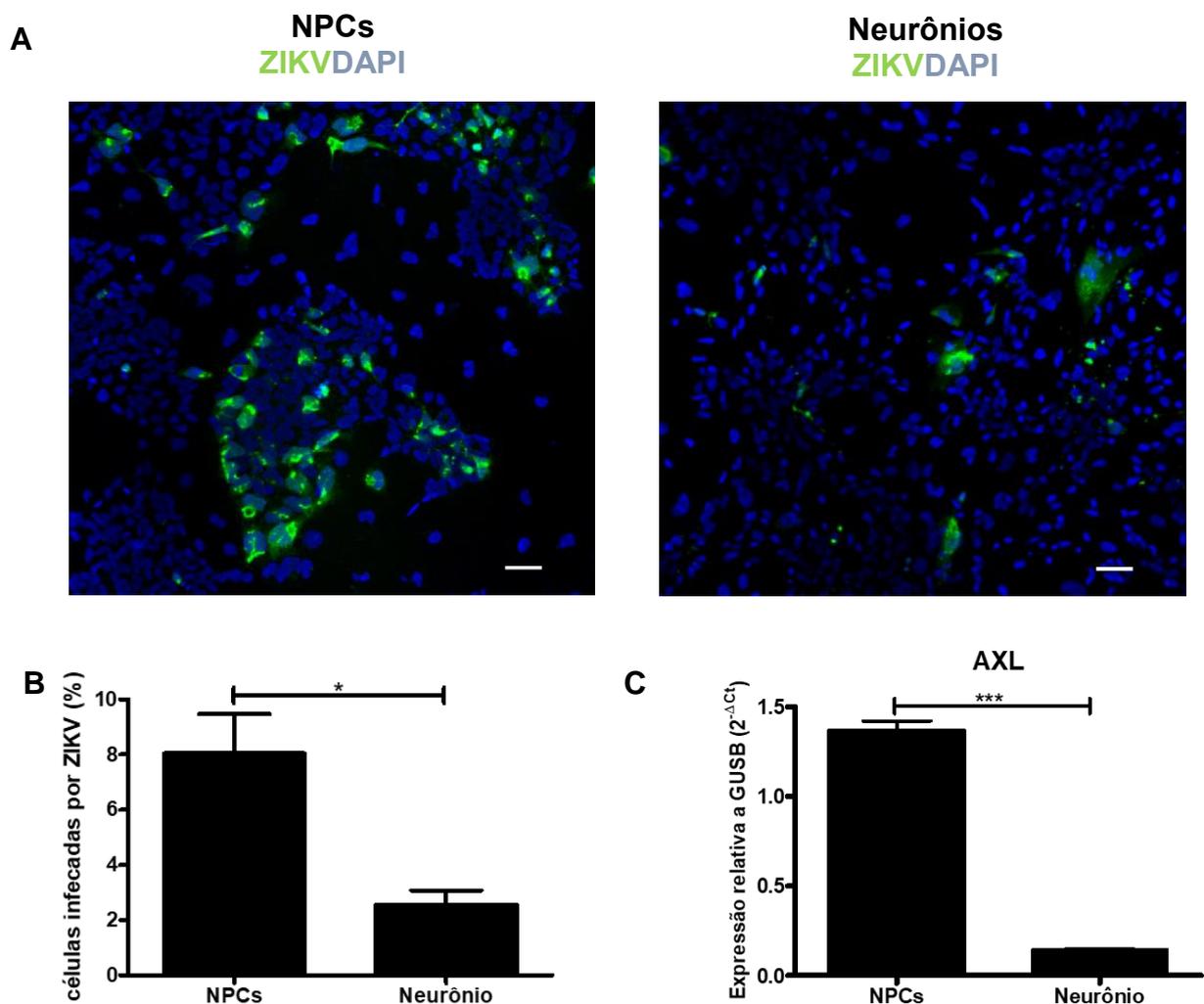


Figura 11. Infecção de NPCs e neurônios humanos com ZIKV. **(A)** Imagens de microscopia confocal representativas de NPCs e neurônios após 48 h de infecção pelo ZIKV na MOI de 1. **(B)** Quantificação de células infectadas por ZIKV. **(C)** Expressão gênica do receptor AXL em NPCs e neurônios. Escala da barra = 100 μ m. Expressão relativa à GUSB. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Valores representam a média \pm EPM de 3 repetições em triplicata.

5.3 DETERMINAÇÃO DA DIFERENÇA DE SUSCETIBILIDADE À INFECÇÃO POR ZIKV EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES

Células HepG2, fibroblastos humanos e NPCs foram infectados pela cepa de ZIKV e avaliados quanto à viabilidade celular após a infecção. As células HepG2 e os fibroblastos não indicaram diferença estatística significativa quanto ao número de células viáveis após a infecção pelo vírus. Sendo assim, das linhagens infectadas, apenas as NPCs apresentaram maior suscetibilidade à infecção (Figura 12A).

Para corroborar o fato de haver mais morte celular desencadeada pela infecção pelo ZIKV, as NPCs foram avaliadas quanto à atividade enzimática de caspase 3 clivada (Figura 12B). Foi observado que estas células têm o processo apoptótico iniciado após a infecção, e que aumenta gradualmente entre 24 e 48 h, com diferenças significativas.

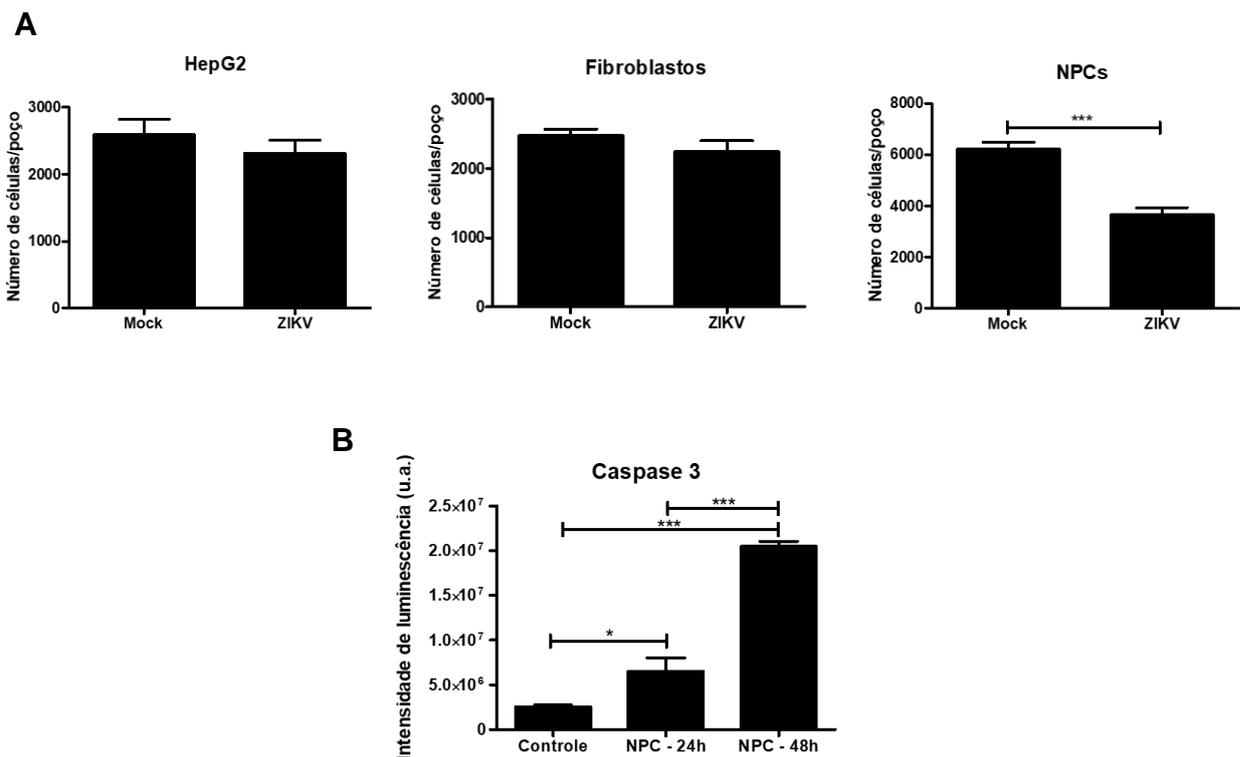


Figura 12. Determinação da diferença de susceptibilidade à infecção por ZIKV em diferentes linhagens celulares. **(A)** Número total de células em cultura após 48 h de infecção por ZIKV na MOI de 1 em HepG2, fibroblastos e NPCs. **(B)** Determinação da atividade enzimática da caspase 3 clivada em cultura de NPCs após 24 e 48 h de infecção por ZIKV. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Valores representam a média \pm EPM de 3-5 repetições. u.a.: unidades arbitrárias.

5.4 TRIAGEM INICIAL DE DROGAS COM POTENCIAL ANTIVIRAL EM LINHAGEM CELULAR HEPG2

Células da linhagem HepG2 foram inicialmente usadas para a triagem de drogas para identificar o agente candidato a ser utilizado nos ensaios farmacológicos subsequentes. Esta triagem inicial consistiu na avaliação das seguintes drogas: cloroquina (CQ), fingolimod (FTY720), mefloquina (MQ), tenofovir (TV), N,N-dimetilfingosina (DMS), azidotimidina (AZT), ácido betulínico (AB), sendo este último a droga que apresentou o melhor efeito antiviral (Figura 13). Os valores de concentrações citotóxicas e inibitórias estão apresentados na tabela 3.

Dentre as drogas testadas, o AB foi a que apresentou maior efeito antiviral em concentração menor (de 6 μM) e com menor toxicidade ($>50 \mu\text{M}$). Na concentração de 25 μM , a inibição viral promovida pelo DMS, FTY e MQ são semelhantes (próxima a 100%) embora tenham demonstrado citotoxicidade maior que o AB, e por esta razão o AB foi selecionado para testes em outras linhagens. As drogas AZT, CQ e TV apresentaram efeito antiviral nulo ou discreto nas concentrações consideradas.

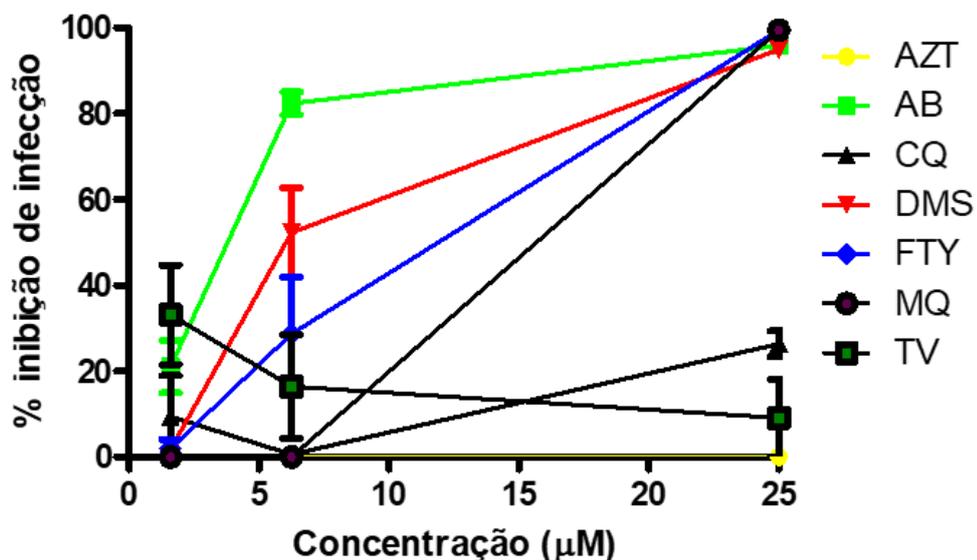


Figura 13. Triagem de drogas após 48 h de infecção por ZIKV na MOI de 1 em HepG2. Percentual de inibição de infecção por ácido betulínico (AB), cloroquina (CQ), fingolimod (FTY720), mefloquina (MQ), tenofovir (TV), N,N-dimetilfingosina (DMS) e azidotimidina (AZT) nas concentrações de 1,6; 6,25 e 25 μM . Valores representam a média \pm EPM de 3 repetições.

Tabela 3. Atividades antivirais e citotóxicas de drogas em linhagem HepG2.

HepG2		
Drogas	CC₅₀ (µM) ± EPM	IC₅₀ (µM) ± EPM
AB	> 50	3,93 ± 0,91
AZT	> 50	> 50
CQ	> 50	33,30 ± 11,58
DMS	29,56 ± 1,32	5,02 ± 1,06
FTY	24,09 ± 1,71	5,36 ± 2,5
MQ	18,38 ± 2,64	18,05 ± 0,58
TV	> 50	> 50

EPM = erro padrão da média. Valores representam a média ± EPM de 3-7 repetições. AB: ácido betulínico; AZT: azidotimidina; CQ: cloroquina; DMS: N,N-Dimetilefingosina; FTY: FTY720 (fingolimod); MQ: mefloquina; TV: tenofovir.

5.5 AVALIAÇÃO DE EFEITO ANTIVIRAL DO ÁCIDO BETULÍNICO EM FIBROBLASTOS DERMAIS HUMANOS

Para efeito comparativo, o AB, selecionado na triagem inicial, foi adicionado à cultura de fibroblastos dermais humanos para avaliar seu efeito antiviral nessas células após a infecção pelo ZIKV e sua citotoxicidade, uma vez que são permissivos à infecção (ALI et al., 2017).

Em relação à linhagem HepG2, o AB promoveu maior citotoxicidade em fibroblastos e menor inibição viral. Nas 3 concentrações (0, 10 e 50 µM) ilustradas no painel de imunofluorescência (Figura 14A) e representadas no gráfico (Figura 14B), a concentração de 50 µM inibiu a replicação viral em até 50%, embora tenha apresentado toxicidade elevada (CC₅₀ de aproximadamente 45 µM), como observado no número de células viáveis após o tratamento (Figura 14C; Tabela 4). Além disso, não houve efeito antiviral na concentração de 10 µM, embora não tenha apresentado toxicidade após o tratamento com a droga.

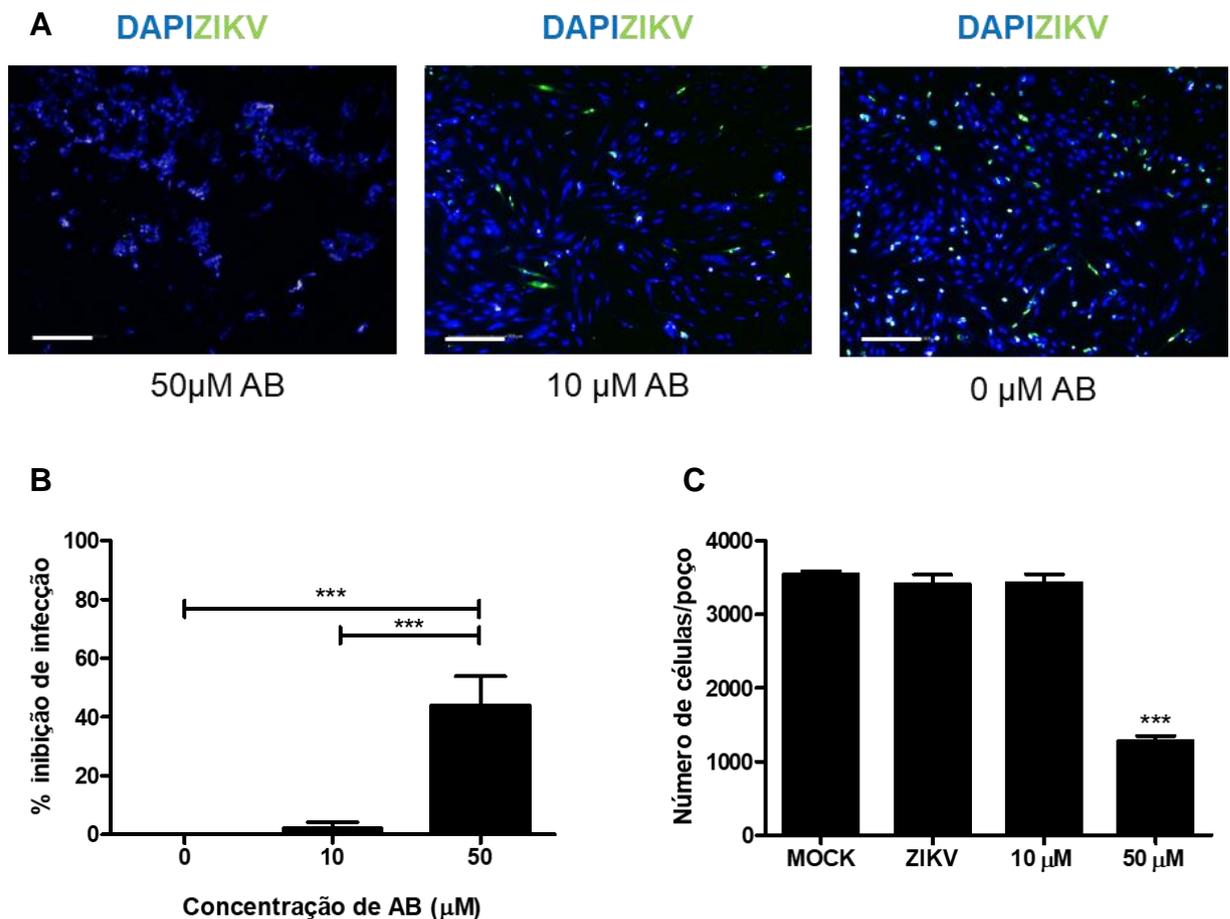


Figura 14. Tratamento de fibroblastos dermais humanos infectados por ZIKV com ácido betulínico (AB) em diferentes concentrações. **(A)** Imagens de microscopia confocal representativas de fibroblastos tratados com AB incubados por 48 h após a infecção pelo ZIKV nas concentrações de 0; 10 e 50 μM e MOI de 1. **(B)** Percentual de inibição após infecção com ZIKV. **(C)** Número de células remanescentes após infecção com ZIKV e tratamento com AB. *** $p < 0,001$. Em (C), *** se refere aos demais grupos. Valores representam a média \pm EPM de 3-5 repetições. Escala das barras = 200 μm.

Tabela 4. Atividades antivirais e citotóxicas de ácido betulínico (AB) e cloroquina (CQ) em linhagem de fibroblastos dermais humanos.

Fibroblastos		
Droga	CC ₅₀ (μM) \pm EPM	IC ₅₀ (μM) \pm EPM
AB	45 \pm 3,39	46,81 \pm 0,85
CQ	>50	>50

EPM = erro padrão da média. Valores representam a média \pm EPM de 3-5 repetições. AB: ácido betulínico; CQ: cloroquina.

5.6 AVALIAÇÃO DE EFEITO ANTIVIRAL DO ÁCIDO BETULÍNICO EM NPCS

Como visto anteriormente, as NPCs são suscetíveis à infecção pelo ZIKV e têm o processo apoptótico desencadeado pelo vírus. Desta forma, o AB foi testado em linhagem de NPCs inicialmente para a avaliação de sua citotoxicidade e de seu efeito anti-ZIKV. Nas 3 concentrações representadas no painel de imunofluorescência (12,5; 25 e 50 μM ; Figura 15A) e na quantificação da infecção pelo ZIKV (Figura 15B), a de 50 μM levou a um efeito de inibição viral elevado, próximo a 100%, ao passo que a de 25 μM inibiu em até 40% a infecção viral, e a concentração de 12,5 μM , por sua vez, inibiu em aproximadamente 10% o ZIKV. Entretanto, quando o número de células viáveis tratadas após a infecção é considerado (Figura 15C), observou-se que a concentração mais alta de AB foi bastante tóxica e reduziu a população de NPCs a níveis sem diferença significativa de células que não receberam tratamento (Zika). Já a concentração intermediária, embora tenha exibido moderada inibição antiviral, também levou à redução da população de NPCs em cultura. Em contrapartida, a menor concentração testada, embora tenha exibido discreto potencial antiviral, surpreendentemente manteve o número de células viáveis após a infecção com ZIKV sem diferença estatística significativa quando comparada com as NPCs que não receberam tratamento e não tiveram infecção (*Mock*).

Finalmente, para corroborar o fato de haver menos morte celular em concentrações mais baixas de AB, a presença de caspase 3 clivada foi avaliada em diferentes concentrações do tratamento com AB em NPCs após 48 h de infecção pelo ZIKV (Figuras 16A e B). Foi observado que nas concentrações próximas a 10 μM , há menos marcação positiva para caspase 3 clivada, cujo fato está relacionado a um maior número de células viáveis, ao passo que em concentrações superiores a 25 μM apresentaram aumento de caspase 3 clivada e menor viabilidade celular. A citotoxicidade do AB está indicada na tabela 5.

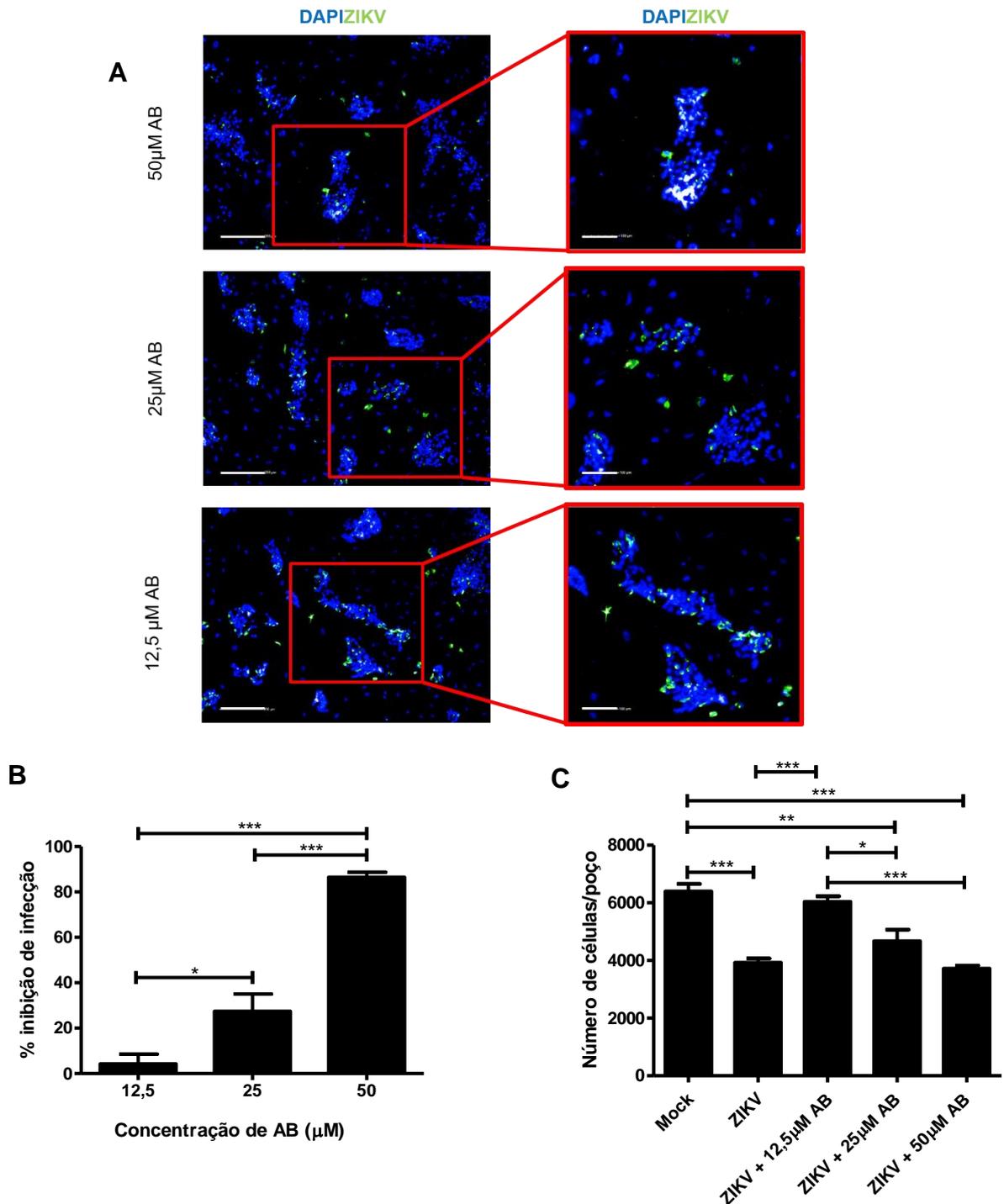


Figura 15. Tratamento de NPCs infectadas por ZIKV com ácido betulínico (AB) em diferentes concentrações. **(A)** Imagens de microscopia confocal representativas de NPCs tratadas com AB incubado por 48 h após a infecção por ZIKV nas concentrações de 12,5; 25; e 50 μ M e MOI de 1. **(B)** Percentual de inibição após infecção com ZIKV. **(C)** Número de células remanescentes após infecção com ZIKV e tratamento com AB. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$. Valores representam a média \pm EPM de 3 repetições.

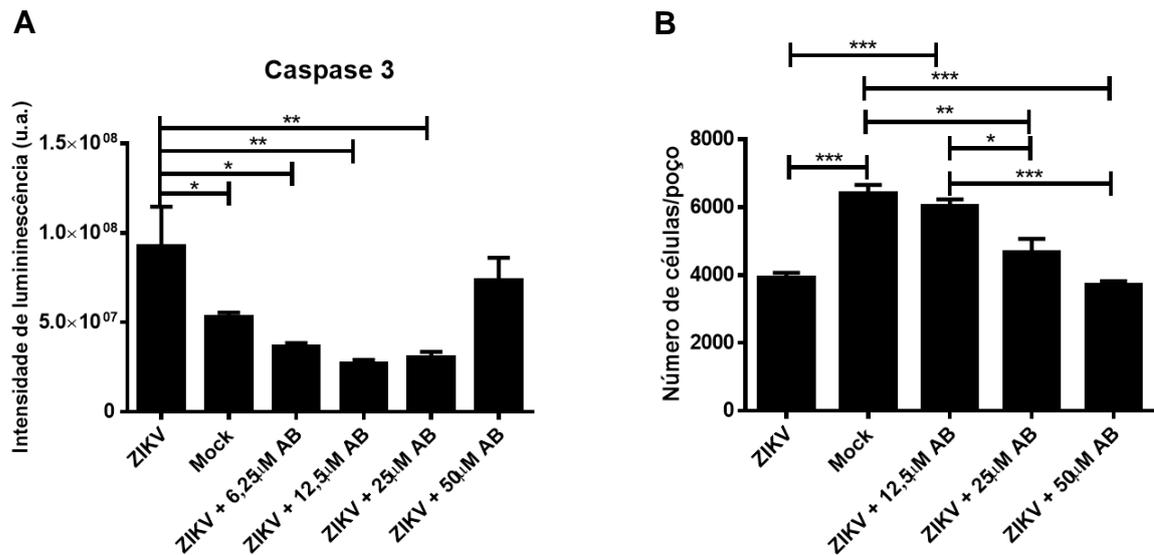


Figura 16. Determinação de morte celular de NPCs infectadas por ZIKV e tratadas com ácido betulínico. **(A)** Detecção da atividade enzimática de caspase 3 clivada. **(B)** Número total de células presentes no ensaio para detecção de caspase 3 clivada. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$. Valores representam a média \pm EPM o de 3 repetições.

Tabela 5. Atividades antivirais e citotóxicas de ácido betulínico (AB) e cloroquina (CQ) em linhagem de NPCs.

NPC		
Droga	CC ₅₀ (μ M) \pm EPM	IC ₅₀ (μ M) \pm EPM
AB	>50	20,30 \pm 1,50
CQ	>50	>50

EPM = erro padrão da média. Valores representam a média \pm EPM de 2-5 repetições. AB: ácido betulínico; CQ: cloroquina.

6 DISCUSSÃO

Tendo em vista a necessidade de identificar novas drogas com atividade antiviral e pelo fato de não haver uma terapia antiviral específica contra o ZIKV, neste trabalho mostramos a padronização de um método para triagem de drogas utilizando NPCs, e comparativamente em outros tipos celulares, visando não apenas a identificação de agentes anti-ZIKV, mas também neuroprotetores.

As NPCs são células multipotentes capazes de se diferenciar nos principais fenótipos neurais, são permissivas à infecção pelo ZIKV e também muito suscetíveis aos efeitos da replicação viral, fornecendo uma explicação para os fenótipos de desenvolvimento observados em algumas gestações. Promover um ensaio de triagem de drogas com este tipo celular, embora seja laborioso e caro, significa utilizar seu potencial de avaliação de neurotoxicidade, visto que pode prever riscos relacionados a exposição química em seres humanos através de um modelo celular associado aos efeitos do ZIKV no desenvolvimento neurológico. Conforme descrito na literatura científica, as NPCs foram geradas e caracterizadas neste trabalho, apresentando morfologia e crescimentos adequados; marcação positiva para os principais marcadores atribuídos à sua identidade enquanto progenitoras, tais como nestina e Sox2; expressão gênica de DCX, SOX2 e PAX6; e, por fim, foram capazes de dar origem a neurônios. A população de NPCs-Sox2⁺ obtida aqui já foi reportada por alguns autores que sugerem que o ZIKV pode causar microcefalia ao esgotar esta população, uma vez que são altamente suscetíveis ao vírus (SOUZA et al., 2016).

Paralelamente, a determinação de hepatotoxicidade induzida por drogas é essencial, uma vez este é um fator que pode impedir que novos candidatos a medicamentos sejam levados a testes nas fases posteriores do desenvolvimento de fármacos. Neste contexto, para a realização da triagem de drogas, usamos inicialmente a linhagem humana de células de carcinoma hepatocelular HepG2 para a triagem de drogas por consistir em uma linhagem amplamente usada para estudo do metabolismo de drogas e de hepatotoxicidade (DONATO et al., 2015), além de ser acessível e fácil de se manter em cultura. Adicionalmente, esta linhagem já foi usada por outros autores para identificar sua resposta à infecção pelo ZIKV. Foi reportado que as células HepG2 favorecem alta expressão da proteína NS1 do vírus, causam menos morte celular e boa replicação viral (HIMMELSBACH e HILDT, 2018). Para os testes, selecionamos uma coleção de drogas que já estão disponíveis para tratamento

de outras doenças ou que apresentaram algum tipo de efeito contra a infecção por flavivírus descritos na literatura científica. Neste trabalho, consideramos como efeito antiviral satisfatório valores superiores a 80% de inibição do ZIKV.

Após a triagem inicial, foi importante considerar como as drogas selecionadas se comportariam em outra linhagem humana, como fibroblastos dermais. Observamos que os fibroblastos infectados eram permissivos à infecção, favorecendo a replicação viral sem perda de células viáveis. Como demonstrado por Hamel e colaboradores, o ZIKV entra na célula através do receptor de fosfatidilserina AXL e regula positivamente a via de autofagia, levando a um aumento da replicação viral nos autofagossomos, mantendo a infecção (HAMEL et al., 2015). Este mesmo receptor também parece ser importante para ajudar a explicar o maior número de células infectadas com o vírus nas NPCs derivadas de iPSCs quando comparadas com suas contrapartes neuronais, embora este receptor não seja exclusivamente essencial para a infecção por ZIKV. Outros receptores adicionais, e que não foram considerados neste trabalho, podem ser importantes para a entrada viral, tais como membros das famílias de receptores TIM e TAM (HAMEL et al., 2015), que podem ajudar a compreender porque outros tipos celulares são infectados (WELLS et al., 2016; MERFELD et al., 2017).

Quando consideramos comparar as três linhagens celulares diante da infecção pelo ZIKV do ponto de vista do número de células viáveis, verificamos que houve redução no número de NPCs, o que foi corroborado pela atividade enzimática de caspase 3 clivada, um marcador de apoptose amplamente usado, denotando que NPCs passam por processo de apoptose desencadeado após a infecção e que se torna mais frequente com o passar do tempo, aumentando substancialmente em 48 h. Isto está de acordo com Dang e colaboradores que demonstraram que a infecção por ZIKV diminui a população de progenitores neurais em organoides cerebrais humanos derivados de hESC (DANG et al., 2016). Somado a isto, já foi evidenciado que as NPCs infectadas pelo ZIKV são induzidas a anormalidades na mitose e levadas à morte celular apoptótica (SOUZA et al., 2016). Em conjunto, estes resultados indicam uma proliferação prejudicada observada nas NPCs e que avança rapidamente para a morte celular por apoptose.

Dentre a coleção de drogas testadas, apenas o terpenoide ácido betulínico se destacou em termos de inibição viral (superior à 80%) após 48 h de infecção pelo ZIKV e dependente da concentração utilizada. Os produtos naturais desempenham um papel importante na descoberta de drogas e desenvolvimento (NEWMAN e CRAGG,

2012), uma vez que exibem uma ampla gama de farmacóforos e estereoquímica favorável. Os terpenoides constituem um dos maiores grupos de produtos naturais, e a diversidade de estruturas e funções têm provocado maior interesse em seus usos comerciais (THOPPIL e BISHAYEE, 2011). Um membro deste grupo inclui AB, um triterpenoide pentacíclico do tipo lupane abundante no reino vegetal, que pode ser isolado de várias espécies de plantas ou obtidas de seu precursor metabólico, betulina (YOGEE SWARI e SRIRAM, 2005). O AB e seus derivados possuem atividade anti-HIV (BAGLIN et al., 2003), anti-bacteriana (CHANDRAMU et al., 2003), anti-helmíntica (ENWEREM et al., 2001), anti-inflamatória (COSTA et al., 2014) e uma potente atividade citotóxica contra um painel grande de linhagens celulares tumorais (CHAKRABORTY et al., 2015; DRAG-ZALESINSKA et al., 2009). Ainda mais importante, o AB é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, o que o torna um composto adequado para o tratamento de distúrbios do SNC (YOGEE SWARI e SRIRAM, 2005).

O tratamento com AB em fibroblastos infectados pelo ZIKV apresentou toxicidade elevada sem atividade antiviral nas concentrações testadas. Em contrapartida, as NPCs tratadas com AB após 48 h de infecção por ZIKV apresentaram menor toxicidade e modesta atividade antiviral, embora o número de células viáveis tratadas após a infecção surpreendentemente não tenha apresentado diferença em relação ao número de NPCs que não receberam tratamento e não tiveram infecção. Somado a isto, houve menor produção de caspase 3 clivada. Em conjunto, os resultados em NPCs apontaram para um papel mais neuroprotetor do que antiviral do AB. Alguns autores já indicaram esta característica em lesão cerebral (JIAO et al., 2016) e doenças neurológicas (NAVABI et al., 2018) em experimentos que utilizaram células isoladas a partir de modelos animais. Até o momento, o papel neuroprotetor conferido pelo AB não foi investigado em NPCs derivadas de iPSCs provindas de doadores humanos, nem a relevância deste papel quando considerada a infecção pelo ZIKV. De toda forma, é importante verificar se a atividade viral do ácido betulínico pode ser satisfatória em outros membros da família Flaviviridae, como, DENV e WNV.

Vale ressaltar que a coleção de drogas selecionadas neste trabalho foi pequena e que o AB, embora tenha sido promissor quanto ao papel citoprotetor, demonstrou ação tóxica. Uma alternativa interessante consiste na modificação da estrutura

química desta droga para reduzir sua toxicidade. Esta abordagem já foi utilizada por outros autores que alteraram a estrutura química do AB para redução de citotoxicidade, melhor solubilidade e aumento da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* (MEIRA et al., 2016). Além disso, uma possível associação com outra droga anti-ZIKV pode ser considerada, como mefloquina (BARROWS et al., 2016) e cloroquina (DELVECHIO et al., 2016), já triadas em outros ensaios. Desta forma, combinar os efeitos que impedem a replicação viral com a redução de morte celular das NPCs pode conferir um duplo benefício.

Embora produtos naturais contribuam para a descoberta de drogas, uma alternativa atraente envolve o reposicionamento de droga cujo processo consiste em encontrar novas indicações terapêuticas para medicamentos existentes. Pode ser uma abordagem eficiente para a descoberta porque muitos medicamentos existentes têm 1) formulações e métodos de fabricação estabelecidos, 2) dados extensivos de distribuição de absorção, metabolismo, excreção e toxicidade, 3) os parâmetros de segurança de teste clínico já foram finalizados e, portanto, são menos prováveis a falhar em ensaios clínicos futuros devido a efeitos adversos e 4) apresentam dados de segurança de fase IV (vigilância pós-comercialização), que são caros e demorados para obter (LI e JONES, 2012).

Os resultados aqui apresentados demonstraram a importância de se fazer um ensaio com NPCs humanas sob a perspectiva de neurotoxicidade. Neste trabalho, foram geradas NPCs de um doador, apenas. Recentemente, pesquisadores identificaram um conjunto de alterações genéticas responsável por aumentar a suscetibilidade de alguns bebês às consequências neurológicas da infecção, a partir de um estudo que gerou NPCs de gêmeos discordantes para SCZ (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018). Assim, aumentar o número de doadores para a geração de NPCs se torna relevante para contemplar as diferenças genéticas pertinentes a cada doador e que pode ter implicação na resposta da droga a ser utilizada no paciente.

Finalmente, nosso estudo reforça que a cepa de ZIKV brasileira é altamente letal para as NPCs humanas que expressam o fator de transcrição Sox2 e que são altamente suscetíveis ao ZIKV. Contudo, nossos resultados sugerem que o AB é um candidato a droga que, ao ser administrado em NPCs infectadas pelo ZIKV, as tornam menos suscetíveis ao vírus e desencadeiam menos processo apoptótico decorrente da infecção viral. Vale ressaltar que a via ou vias de sinalização que são reguladas a

partir do tratamento com AB ou seu mecanismo de ação ainda não estão elucidadas. Alguns autores sugerem que parte dos efeitos imunomodulatórios do AB estão relacionados com a inibição do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (MEIRA et al, 2017). Já foi reportado que a infecção por ZIKV aumenta os níveis totais da proteína p53 e sua acumulação nuclear está correlacionada com o estresse genotóxico e a indução de apoptose (GHOZZI et al., 2016). Além disso, a indução de p53 causa uma ativação de NF- κ B que se correlaciona com a capacidade de p53 para induzir apoptose. Assim, a inibição ou a perda de atividade de NF- κ B reduzem a apoptose induzida por p53, indicando que o NF- κ B é essencial na morte celular mediada por esta proteína (RYAN et al., 2000). Entretanto, a relação do AB com estas vias não foi abordada neste trabalho e ainda precisa ser investigada.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, estabelecemos o ensaio de triagem de drogas com NPCs que se mostrou viável por permitir avaliar a neurotoxicidade de agentes anti-ZIKV quanto ao aspecto antiviral e neuroprotetor. Além disso, dentre as drogas testadas, apenas o ácido betulínico, um triterpenoide pentacíclico do tipo lupane, revelou papel neuroprotetor evidenciado em NPCs infectadas pelo ZIKV, as quais são muito suscetíveis aos efeitos da infecção viral.

REFERÊNCIAS

- ALI, A. et al. Advances in research on Zika virus. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 10, n. 4, p. 321-331, 2017.
- ASHBURN, T.T.; THOR, K.B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 8, p. 673-683, 2004.
- AUBRY, M. et al. Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011–2013. **Int. J. Infect. Dis.** v. 41, p. 11–12, 2015.
- BAGLIN, I. et al. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 3, n. 6, p. 525-539, 2003.
- BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Constituents of the Stem-Bark of *Zizyphus joazeiro*. **J. Nat. Prod.**, v. 48, n. 1, p. 152-153, 1985.
- BARROWS, N.J. et al. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. **Cell Host Microb.**, v. 20, n. 2, p. 259-270, 2016.
- BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. **Lancet.** v. S0140-6736 n. 17, p. 31450-31452, 2017.
- BAYLESS, N.L. et al. Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. **Cell Host Microb.**, v. 20, n. 4, p. 423-428, 2016.
- BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill.**, v. 19, v. 13, p. 20751, 2014.
- BOLDESCU, V. et al. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, Zika and beyond. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 16, n. 8, p. 565-586, 2017.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletins Epidemiológicos—Secretaria de Vigilância em Saúde <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/boletim-epidemiologico> (2017).
- BUCHSER, W. et al. Assay development guidelines for image-based high content screening, high content analysis and high content imaging. 2012. In: SITTAMPALAM, G.S. et al. (Eds). **Assay Guidance Manual**. Bethesda, MD: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.https.sci-hub.tw/books/NBK100913/>
- CAIRES-JÚNIOR, L.C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nat. Commun.**, v. 9, n. 1, p. 475, 2018.

- CAMP, J.G. et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 112, n. 51, p. 15672-15677, 2015.
- CAMPOS, G.S., BANDEIRA, A.C., SARDI, S.I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** v. 21, n. 10, p.1885-6, 2015.
- CAO-LORMEAU, V.M. et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerg. Infect. Dis.** v. 20, n. 6, p. 1085-6, 2014.
- CAROCCI, M. et al. The bioactive lipid 4-hydroxyphenyl retinamide inhibits flavivirus replication. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 59, n. 1, p. 85-95, 2015.
- CARPENTER, M.K. et al. In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. **Exp. Neurol.** v. 158, n. 2, p. 265-78, 1999.
- CARTEAUX, G. et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **N. Engl. J. Med.** v. 374, n. 16, p. 1595-6, 2016.
- CHAKRABORTY, B. et al. Synthesis and biological evaluation of a novel betulinic acid derivative as an inducer of apoptosis in human colon carcinoma cells (HT-29). **Eur. J. Med. Chem.** v. 102, p. 93-105, 2015.
- CHANDRAMU, C. et al. Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. **Phytother. Res.** v. 17, n. 2, p. 129-34, 2003.
- CHEN, Y.L. et al. Inhibition of dengue virus RNA synthesis by an adenosine nucleoside. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 54, n. 7, p. 2932-9, 2010.
- CIESEK, S. et al. The Suppressive Effect That Myriocin Has on Hepatitis C Virus RNA Replication Is Independent of Inhibition of Serine Palmitoyl Transferase. **The Journal of Infectious Diseases.** v. 198, N. 7, p. 1091-1093, 2008.
- COLT, S. et al. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 11, n. 4, e0005528, 2017.
- COSTA, J.F. et al. Potent anti-inflammatory activity of betulinic acid treatment in a model of lethal endotoxemia. **Int. Immunopharmacol.** v. 23, n. 2:469-74, 2014.
- DANG, J. et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell.** 2016 Aug 4; v. 19, n. 2, p. 258-65, 2016.
- DELVECCHIO, R. et al. Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models. **Viruses.** v. 8, n. 12, p. 322, 2016.
- DICK, G.W., KITCHEN, S.F., HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 46, n. 5, p. 509-20, 1952.

DONATO M.T., TOLOSA L., GÓMEZ-LECHÓN M.J. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. In: Vinken M., Rogiers V. (eds) *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. **Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**, v. 1250, 2015.

DO ROSÁRIO, M.S. et al. Guillain-Barré Syndrome After Zika Virus Infection in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 95, n. 5, p. 1157-1160, 2016.

DRAG-ZALESINSKA, M. et al. Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 19, n. 16, p. 4814-7, 2009.

DUFFY, M.R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N. Engl. J. Med.** v. 360, n. 24, p. 2536-43, 2009.

ENWEREM, N.M. et al. Anthelmintic activity of the stem bark extracts of *Berlina grandiflora* and one of its active principles, Betulinic acid. **Phytomedicine**. v. 8, n. 2, p. 112-4, 2001.

ESTOFOLETE, F. C. et al. Clinical and laboratory profile of Zika virus infection in dengue suspected patients: A case series. **J. Clin. Virol.** v. 81, p. 25-30, 2016.

FARIA, N.R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**. v. 352, n. 6283, p. 345-9, 2016.

FARIA, N.R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**. v. 546, n. 7658, p. 406-410, 2017.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. Bird B, ed. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 8, n. 1, e2636, 2014.

FILIFE, A.R., MARTINS, C.M., ROCHA, H. Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. **Arch. Gesamte Virusforsch.** v. 43, n. 4, p.315-9, 1973.

FOY, B.D. et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg. Infect. Dis.** v. 17, n. 5, p. 880-2, 2011.

GARCEZ, P.P. et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**.; v. 352, n. 6287, p. 816-8, 2016.

GENG, Y. et al. Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. **Neuro Oncol.** v. 12, n. 5, p. 473-81, 2010.

GHOZZI, V.E. et al. ZIKA virus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations involved in severe forms of genetic microcephaly and p53. **Cell Death Dis.** v. 7, n. 10, e2440, 2016.

GLEESON, J.G. et al. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. **Neuron**. v. 23, n. 2, p. 257-71, 1999.

HAMANOUE, M. et al. Cell-permeable p38 MAP kinase promotes migration of adult neural stem/progenitor cells. **Scientific Reports**. v. 6, n. 24279, 2016.

HAMER, D.H. et al. Epidemiology, Prevention, and Potential Future Treatments of Sexually Transmitted Zika Virus Infection. **Curr. Infect. Dis. Rep.** v. 19, n. 4, p.16, 2017.

HAYES, E.B. Zika Virus Outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**. v. 15, n. 9, p.1347-1350, 2009.

HIMMELSBACH, K., HILDT, E. Identification of various cell culture models for the study of Zika virus. **World J. Virol.** v. 7, n. 1, p. 10-20, 2018.

HIRSCH, A.J. et al. Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. **PLoS Pathog.** v. 13, n. 3, e1006219, 2017.

HUANG, Y-J.S. et al. Flavivirus-Mosquito Interactions. **Clem. R.** v. 6, n. 11, p. 4703-4730, 2014.

HUTTON, S.R., PEVNY, L.H. SOX2 expression levels distinguish between neural progenitor populations of the developing dorsal telencephalon. **Dev. Biol.** v. 352, n. 1, p. 40-7, 2011.

JIAO, S. et al. Betulinic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by activating the PI3K/Akt signaling pathway. **Biomed. Pharmacother.** v. 84, p. 1533-1537, 2016.

KAHLER, D.J. et al. Improved Methods for Reprogramming Human Dermal Fibroblasts Using Fluorescence Activated Cell Sorting. **PLOS ONE**. v.8, n. 3. 2013.

KUBLIN, J.L., WHITNEY, J.B. Zika Virus Research Models. **Virus Res.** n. 17, p. 30622-6, 2017.

LADHANI, S.N. et al. Outbreak of Zika virus disease in the Americas and the association with microcephaly, congenital malformations and Guillain-Barré syndrome. **Arch. Dis. Child.** v. 101, n. 7, p. :600-2, 2016.

LANCIOTTI, R.S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg. Infect. Dis.** v. 14, n. 8, p. 1232-9, 2008.

LAZEAR, H.M., et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host Microbe**. v. 19, n. 5, p. 720–730, 2016.

LEDERMANN, J.P. et al. Aedes hensilli as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 8, n. 10, e3188, 2014.

LEUNG, G.H. et al. Zika virus infection in australia following a monkey bite in indonesia. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**. v. 46, n. 3, p.460-4, 2015.

- LI, C. et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**. v. 19, n. 1, p.120-6, 2016b.
- LI, H. et al. Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. **Cell Stem Cell**. v. 19, n. 5, p. 593-598, 2016a.
- LI, Y.Y., JONES, S.J. Drug repositioning for personalized medicine. **Genome Med**. v. 4, n. 3, p. 27, 2012.
- LIN, C. et al. Betulinic acid exerts anti-hepatitis C virus activity via the suppression of NF- κ B- and MAPK-ERK1/2-mediated COX-2 expression. **Br. J. Pharmacol**. v. 172, n. 18, p. 4481–4492, 2015.
- MANSUY, J.M. et al. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? **Lancet Infect. Dis**. v.16, n. 4, p. 405, 2016.
- MEIRA, C.S. et al. Antiparasitic evaluation of betulinic acid derivatives reveals effective and selective anti-Trypanosoma cruzi inhibitors. **Exp. Parasitol**. v. 166, p. 108-15, 2016.
- MEIRA, C.S. et al. Betulinic acid derivative BA5, a dual NF- κ B/calcineurin inhibitor, alleviates experimental shock and delayed hypersensitivity. **Eur. J. Pharmacol**. v. 815, p.156-165, 2017.
- MEMBERG, S.P., HALL, A.K. Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin. **J. Neurobiol**. v. 27, n. 1, p. 26-43, 1995.
- MERFELD, E. et al. Potential mechanisms of Zika-linked microcephaly. **Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol**. v. 6, n. 4 e273, 2017.
- MINER, J.J., DIAMOND, M.S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host Microbe**. v. 21, n. 2, p. 134-142, 2017.
- MINER, J.J. et al. Zika virus infection in mice causes pan-uveitis with shedding of virus in tears. **Cell Rep**. 2016 Sep 20; v. 16, n. 12, p. 3208–3218, 2016.
- MOORE, C.A. et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. **JAMA Pediatr**. v. 171, n. 3, p. 288-295, 2017.
- MORRISON, T.E., DIAMOND, M.S. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. **J. Virol**. v. 91, n. 8, pii: e00009-17, 2017.
- MUSSO, D., GUBLER, D.J. Zika Virus. **Clin. Microbiol. Rev**. v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016.
- MUSSO, D., NILLES, E.J., CAO-LORMEAU, V.M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clin. Microbiol. Infect**. v. 20, n. 10, p. 595-6, 2014.
- MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg. Infect. Dis**. v. 21, n. 3, p. 552, 2015.

NAVABI, S.P. et al. The effects of betulinic acid on neurobehavioral activity, electrophysiology and histological changes in an animal model of the Alzheimer's disease. **Behav. Brain Res.**; v. 337, p. 99-106, 2018.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** v. 75, n. 3, p. 311-35, 2012.

OKITA, K. et al. A more efficient method to generate integration-free human iPSC cells. **Nat. Methods.** v. 8, n. 5, p. 409-12, 2011.

OLIVEIRA-MELO, A.S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound Obstet. Gynecol.** v. 47, n. 1, p. 6-7, 2016.

OSUMI, N. et al. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. **Stem Cells.** v. 26, n. 7, p.1663-72, 2008.

PACHECO, O. et al. Zika Virus Disease in Colombia - Preliminary Report. **N. Engl. J. Med.** 2016.

PETERSEN, L.R. et al. Zika Virus. **N. Engl. J. Med.** v. 374, n. 16, p. 1552-63, 2016.

POOLE, B., OHKUMA, S. Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. **J. Cell Biol.** v. 90, n. 3, p. 665-9, 1981.

REED, L.J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am J. Hyg.** v.27, p. 493-497, 1938.

ROTH, A. et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. **Euro Surveill.** v. 19, n. 41, pii: 20929, 2014.

RÜCKERT, C. et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nat. Commun.** v. 8, p.15412, 2017.

RUSSELL, P.K. The Zika Pandemic - A Perfect Storm? **PLoS Negl. Trop. Dis.** v 10, n. 3, e0004589, 2016.

RYAN, K.M. et al. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. **Nature.** v. 404, n. 6780, p.892-7, 2000.

SCHMITTGEN, T.D., LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat. Protoc.** v. 3, n. 6, p. 1101-8, 2008.

SHI, Y., GAO, G.F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends Biochem. Sci.** v. 42, n. 6, p. 443-456, 2017.

SHIRLEY, D.T., NATARO, J.P. Zika Virus Infection. **Pediatr. Clin. North Am.** v. 64, n. 4, p. 937-951, 2017.

SIMPSON, D.I. Zika virus infection in man. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 58, p. 335-8, 1964.

SOLTANI, M.H. et al. Microtubule-Associated Protein 2, a Marker of Neuronal Differentiation, Induces Mitotic Defects, Inhibits Growth of Melanoma Cells, and Predicts Metastatic Potential of Cutaneous Melanoma. **Am. J. Pathol.** v. 166, n. 6, p. 1841–1850, 2005.

SONG, B.H. et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **J. Neuroimmunol.** v. 308, p. 50-64, 2017.

SOUZA, B.S. et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. **Sci. Rep.** v. 6, p. 39775, 2016.

SUZUKI, S. et al. The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. **J. Histochem. Cytochem.** v. 58, n. 8, p. 721–730, 2010.

SZYMAŃSKI, P., MARKOWICZ, M., MIKICIUK-OLASIK, E. Adaptation of High-Throughput Screening in Drug Discovery—Toxicological Screening Tests. **Int. J. Mol. Sci.** v. 13, n. 1, p. 427–452, 2012.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell.** v. 131, n. 5, p. 861-72, 2007.

TANG, H. et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell.** v. 18, n. 5, p. 587-90, 2016.

THOPPIL, R.J., BISHAYEE, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. **World J. Hepatol.** v. 3, n. 9, p. 228–249, 2011.

UNNI, S.K. et al. Japanese encephalitis virus: from genome to infectome. **Microbes Infect.** v. 13, n. 4, p. 312-21, 2011.

VENTURA, L.O. et al. Visual impairment in children with congenital Zika syndrome. **J. AAPOS.** n. 17, p. 30311-7, 2017.

VERNEKAR, S.K. et al. 5'-Silylated 3'-1,2,3-triazolyl Thymidine Analogues as Inhibitors of West Nile Virus and Dengue Virus. **J. Med. Chem.** v. 58, n. 9, p. 4016-28, 2015.

WAGGONER, J.J., PINSKY, B.A. Zika virus: diagnostics for an emerging pandemic threat. **J. Clin. Microbiol.** n. 54, p. 860-867, 2016.

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.

WILLMANN, J.K. et al. Molecular imaging in drug development. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 7, n. 7, p. 591-607, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO statement on the first meeting of the international health regulations (2005) (IHR 2005) emergency committee on zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. 2016.

WOROBAY, M. Epidemiology: Molecular Mapping of Zika Spread. **Nature**. v. 546, n.7658, p. 355-357, 2017.

YOGEESWARI P., SRIRAM, D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. **Curr. Med. Chem.** v. 12, n. 6, p. 657-66, 2005.

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

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, 2017.

ZOCK, J.M., Applications of High Content Screening in Life Science Research. **Comb. Chem. High Throughput Screen**. v. 12, n. 9, p. 870–876, 2009.