



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

Gabriel Moreira de Souza

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE GAP-43 COMO
FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE NEUROTOXICIDADE INDUZIDA
PELO ZIKA VÍRUS EM CÉLULAS PC-12**

BRASÍLIA, DF

2019

GABRIEL MOREIRA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE GAP-43 COMO
FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE NEUROTOXICIDADE INDUZIDA
PELO ZIKA VÍRUS EM CÉLULAS PC-12**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Farmácia na Faculdade de
Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Djane Braz Duarte

Co-Orientador: Me Henrique Rodrigues de
Oliveira

BRASÍLIA, DF

2019

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE GAP-43 COMO
FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE NEUROTOXICIDADE INDUZIDA
PELO ZIKA VÍRUS EM CÉLULAS PC-12**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Djane Braz Duarte
(FS/Universidade de Brasília)

Me. Kaian Amorim Teles
(FARMOL/Universidade de Brasília)

Dra. Cinthia Gabriel Meireles
(Ministério da Saúde)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer a Deus pela oportunidade de mais uma conquista na minha vida, toda honra e toda glória ao Senhor.

Gostaria de agradecer à toda a minha família, em especial aos meus pais Nélia e Cirilo, meu irmão Daniel que sempre me apoiaram e me passaram valores que levarei pelo resto da minha vida, obrigado por nunca medirem esforços para que eu tivesse a melhor educação possível e pelo apoio nos piores e melhores momentos da minha vida. Queria agradecer também à minha avó Uelma pelo amor e carinho que teve comigo nesta fase da minha vida, a senhora é muito especial para mim.

À minha namorada Mariana Neiva que foi o meu braço direito e esquerdo dentro da faculdade e fora dela também, muito obrigado por ser essa pessoa tão especial e carinhosa comigo e por ser uma pessoa que sempre me acolheu e ajudou, seu amor e companhia me fizeram mais forte nessa jornada, que nossos objetivos sejam realizados e a felicidade seja rotina em nossas vidas! Essa conquista também é sua! Te amo morzinho.

Queria agradecer aos meus tios Eudes, tia Cida e Edna pelo apoio em momentos difíceis, pelo carinho, conselhos e o companheirismo. Todos os meus primos, em especial Vinícius, Hyago e Gesiane que sempre elevaram o meu astral e me incentivaram em momentos de dificuldade, obrigado pelo apoio. À toda a minha família que de alguma maneira me ajudou nessa caminhada.

Queria dedicar esse TCC ao meu primo Lucas Marcelo e a minha avó Nina que partiram dessa vida, essa conquista também é uma pequena homenagem que posso fazer para vocês. As pessoas não morrem, a não ser que sejam esquecidas! E vocês vão estar sempre dentro das minhas lembranças e nos momentos felizes em que vivemos.

À minha orientadora Djane Braz ou minha mãe científica, faltam palavras para descrever o tanto que gosto da senhora! Obrigado pela sua dedicação, paciência, conselhos, puxões de orelhas, por abrir a porta do grupo em um momento delicado da minha vida e principalmente pelas suas risadas. Levo comigo, admiração pela senhora e pelo seu trabalho. Obrigado por compartilhar o conhecimento e sua sabedoria.

Ao meu co-orientador Henrique Rodrigues (Amarelão) que tanto me ajudou no laboratório e fora dele, muito obrigado pela sua dedicação, empenho e esforço para que este

trabalho desse certo. Nesse tempo aprendi muita coisa com você, obrigado pelos conselhos, atenção, amizade. Que essa nova etapa da sua vida seja repleta de conquistas e sabedoria.

Aos professores, técnicos, estagiários e alunos do Laboratório de Farmacologia Molecular – FarMol, principalmente ao grupo Farmador (Andressa, Denyse, Paulo e Barbara) pela convivência e troca de experiências.

Agradeço à Dra. Cinthia Gabriel Meireles e Me. Kaian Amorim Teles por tão gentilmente aceitarem compor a banca.

Ao Professor Enrique Roberto Argañaraz do laboratório de neurovirologia molecular (Viromol) e a suas alunas Vanessa e Fernanda, muito obrigado pela ajuda e oportunidade de realização dos experimentos necessários para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos do Segue o Skype e Eu ouvi RUBaiyat por compartilhar experiências, momentos de risada e pelo suporte.

Por fim, agradeço à Universidade de Brasília (UnB) e a Fundação Universidade de Brasília (FUB) pelo suporte logístico e financeiro neste projeto.

*Enfrentando uma luta por dia
Cheguei até aqui
Quando a vida pra mim foi Golias
Eu virei o Davi
Foi tanto gigante que eu derrubei
Batalha travada, mas não desisti
Pra hoje de cabeça erguida dizer: Eu venci.*

Ferrugem

Todos, cedo ou tarde, têm o seu momento de brilhar.

EIICHIRO ODA.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a caracterização da expressão gênica de GAP-43 como ferramenta de análise da neurotoxicidade causada pelo Zika Vírus (ZIKV) em células PC-12 diferenciadas ou não com fator de crescimento do nervo (NGF). As células foram cultivadas com os meios completo (MC) ou meio de diferenciação (MD) com concentrações de 100 ng/mL ou 200 ng/mL de NGF pelos períodos de 24 ou 48h, em placas tratadas com Poli-L-lisina (PLL) ou Colágeno IV. Para a análise da infecção pelo ZIKV as células PC-12 foram expostas ao ZIKV (MOI 1) pelo período de 2 horas e 24h depois da infecção a expressão gênica relativa de GAP-43 e quantificação do RNA viral nas foi determinada por transcrição reversa seguida pela amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-PCRq). Nossos resultados demonstraram que as células PC-12 semeadas em placas tratadas com Colágeno IV obtiveram uma melhor adesão em comparação com o tratamento com PLL. Para as células não infectadas, a diferenciação com NGF 100 ng/mL ou 200 ng/mL, tanto no período de 24h como 48h, não alterou a expressão gênica de GAP-43. Para o pool de células infectadas pelo ZIKV em todas as variáveis analisadas houve aumento de expressão de GAP-43. Nossos dados mostram que o ZIKV infecta as células PC12 e altera a expressão gênica de GAP-43. Desse modo, as células PC-12 podem ser um modelo para o estudo de neurotoxicidade causada pelo ZIKV.

Palavras chave: neurito, PLL, colágeno, neurotoxicidade, ZIKV, GAP-43, PC-12.

ABSTRACT

The aim of the present study was to characterize the GAP-43 gene expression as a tool to analyze the Zika Virus (ZIKV) induced neurotoxicity in differentiated PC-12 cells using nerve growth factor (NGF). The cells were cultured in plates coated with Poly-L-lysine- (PLL) or Collagen IV using complete media (CM) or differentiation media (DM) with 100 ng/mL or 200 ng/mL of NGF, for a period of 24 or 48h. For analysis of ZIKV infection, PC-12 cells were exposed to ZIKV virus (MOI 1) for 2 hours and 24 hours later the GAP-43 gene expression and viral RNA quantification was determined by reverse transcription followed by amplification of the quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCRq). Our results demonstrated that PC-12 cells seeded in Collagen IV-treated plates obtained better adhesion compared to PLL treatment. For uninfected cells, differentiation with NGF 100 ng/mL or 200 ng / mL, in a period 24 h or 48 h, did not alter GAP-43 expression. For the pool of ZIKV-infected cells, in all variables analyzed there was an increase in GAP-43 gene expression. Our data show that ZIKV infects PC-12 cells and alters GAP-43 gene expression. Thus, PC-12 cells could be a good model for the study of ZIKV induced neurotoxicity.

Key words: neurite, PLL, collagen, neurotoxicity, ZIKV, GAP-43, PC-12.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação global pela infecção do Zika vírus.....	17
Figura 2	Fotomicrografia de fase de células PC-12, visão geral.....	19
Figura 3	Fases da neuritogênese ou iniciação neuronal.....	20
Figura 4	Representação esquemática do desenho experimental do plaqueamento de células PC-12 não infectadas pelo ZIKV e os tratamentos utilizados no plaqueamento.....	28
Figura 5	Representação esquemática do desenho experimental da placa utilizada na infecção das células PC-12 pelo ZIKV e os tratamentos utilizados no plaqueamento.....	30
Figura 6	Fotomicrografia de cultura de células PC-12 tratadas com o fator de adesão PLL	39
Figura 7	Fotomicrografia de cultura de células PC-12 tratadas com o fator de adesão colágeno.....	40
Figura 8	Especificidade e eficiência do <i>primers</i> da β -actina e da GAP-43.....	42
Figura 9	As células PC-12 diferenciadas e não diferenciadas em placas tratadas com PLL não alteram a expressão do mRNA de GAP-43 independente dos tratamentos usados	43
Figura 10	As células PC-12 diferenciadas e não diferenciadas em placas tratadas com colágeno IV não alteram a expressão do mRNA de GAP-43 independente dos tratamentos usados	44
Figura 11	As células PC-12 são passíveis de infecção pelo ZIKV e a expressão do RNA viral é menor quando as células são estimuladas com NGF 200 ng/mL	45
Figura 12	Curva de amplificação do RNA viral no sobrenadante de células PC-12 infectadas e não infectadas pelo ZIKV	46

Figura 13	A infecção com o ZIKV induz aumento da expressão da GAP-43 em células PC-12	47
Figura 14	Fotomicrografia de cultura de células PC-12 em placas tratadas com colágeno IV, comparação de grupos sem infecção vs com infecção pelo ZIKV	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Relação dos pares <i>primers</i> utilizados durante o processo de PCR quantitativa em tempo real (PCRq-RT) para quantificação gênica de <i>Gap-43</i>	33
Quadro 2	Relação dos reagentes usados por reação nos experimentos de RT-PCRq.....	35
Quadro 3	Relação dos reagentes usados por reação nos experimentos de RT-PCRq de cDNA.....	36
Quadro 4	Eficiência relativa, r^2 dos pares de <i>primers</i> e inclinação da curva-padrão.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β-actina	Beta actina;
BHK-21	Fibroblastos de rim de hamster;
CaM	Calmodulina;
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar;
CO₂	Dióxido de carbono;
C_t	do inglês <i>Cycle threshold</i> , ciclo limiar;
DEPC	Dicarbonato de dietila;
DNase	Desoxirribonuclease;
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético;
<i>et al</i>	do latim, e outros;
GAP	do inglês, <i>growth associated protein</i> ;
GC	Guanina e citosina;
GRD	Gânglio da raiz dorsal;
HS	do inglês, <i>Horse serum</i> ;
JEV	do inglês, Japanese encephalitis vírus;
LAGIIVIR	Laboratório de Genética e imunologia das infecções virais;
kDa	Quilodalton;
MC	Meio completo;
MD	Meio de diferenciação;
MOI	Multiplicidade de infecção;
NCBI	do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i> ;
NGF	do inglês, <i>Nerve Growth Factor</i> ;
pb	par de base;
PBS	do inglês, Saline Phosphate Buffer;
PCRq	Reação em cadeia da polimerase quantitativa;
PKC	Proteína-quinase C;
PLL	Poli-L-lisina;
RNase	Ribonuclease;
RNA_t	Ácido ribonucleico total;
rpm	Rotações por minuto;

RT	Transcrição Reversa;
RT-PCRq	Transcrição Reversa seguida pela Amplificação por Reação em Cadeia; da Polimerase em Tempo Real quantitativa;
Sbn	Sobrenadante
SFB	Soro fetal bovino;
SGB	Síndrome de Guillain-Barré;
SNC	Sistema nervoso central;
SNP	Sistema nervoso periférico;
Tm	do inglês, <i>melting temperature</i> ;
ZIKV	Zika vírus;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Zika vírus	16
1.2. Células PC-12	18
1.3 Neuritogênese	20
1.4 Proteína associada ao crescimento (GAP-43)	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
4. METODOLOGIA	26
4.1 Materiais	26
4.2 Células	27
4.3 Infecção pelo ZIKV	29
4.4 Isolamento do material genético	31
4.5 Tratamento com DNase	31
4.6 Análise da expressão gênica de GAP-43	32
4.6.1 Análise da expressão gênica por RT-PCRq	34
4.6.2 Deteção e Análise da expressão gênica do vírus por RT-PCRq	35
4.7 Análise estatística	37
5. RESULTADOS	38
5.1. Padronização dos fatores de adesão utilizados nas culturas de células PC-12 ...	38
5.2. Padronização dos <i>primers</i> da β-actina e GAP-43	41
5.3 Avaliação do perfil de expressão gênica de GAP-43 em células PC-12 diferenciadas e não diferenciadas	43
5.4 As células PC-12 são passíveis de infecção pelo ZIKV	44
5.5 Perfil de expressão gênica de GAP-43 em células PC-12 infectadas ou não por ZIKV	47

6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	52
8. PERSPECTIVA	53
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Zika vírus

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus que pertence à família Flaviviridae conhecido desde 1947. Foi isolado pela primeira vez na floresta Zika em Uganda a partir de análise do sangue de macacos do gênero *Rhesus* (Dick, Kitchen e Haddow, 1952).

O primeiro caso de infecção desse vírus em humanos foi descrito na Nigéria no ano de 1969, sendo que a primeira grande epidemia foi descrita nas regiões do Sudeste Asiático e no Pacífico Sul, mais especificamente na ilha Yap, onde houve relato de 185 casos de infecção e uma taxa de soropositividade superior a 74% da população no ano de 2007 (Simpson 1964; para revisão ver Chang *et al.* 2016).

Posteriormente, o segundo grande surto foi descrito na Polinésia Francesa no período de outubro 2013 a abril de 2014 (Cao-Lormeau, 2014). Já no ano de 2015, a América do Sul foi o grande foco de casos do ZIKV. Somente no Brasil estima-se um número de casos entre 440.000 a 1.300.000 (Stockholm, 2015).

Através do contexto histórico abordado é evidente a evolução de casos de infecção pelo ZIKV e a sua migração geográfica pelos continentes. A **Figura 1** representada abaixo demonstra todo o fluxo temporal e geográfico dessa infecção até o ano de 2016.

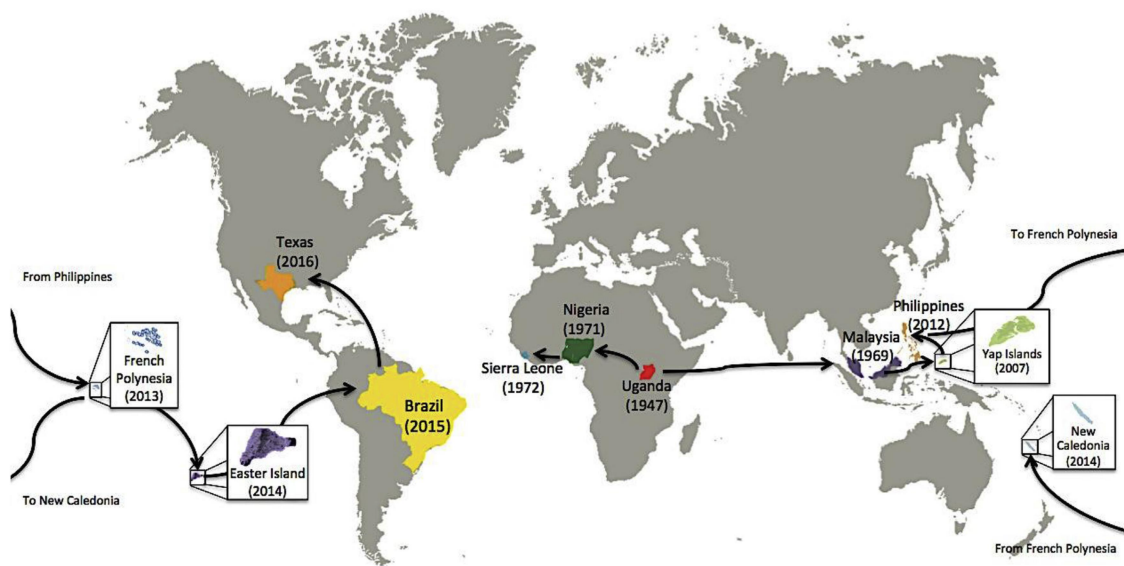


Figura 1. Representação global da infecção pelo Zika vírus. A ilustração demonstra a distribuição geográfica do zika vírus e fluxo migratório do mosquito *Aedes aegypti* pelo mundo no decorrer do tempo. Adaptada de Chang *et al.* 2016.

O ZIKV ganhou notoriedade mundial em função da epidemia de casos de microcefalia ocorrida no Brasil em 2015, sugerindo uma possível associação entre esta síndrome e o vírus (Kuno *et al.*, 1998; Luz, Santos, & Vieira, 2015).

A infecção pelo ZIKV ocorre após a picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti*. Uma vez na corrente sanguínea do hospedeiro o vírus pode infectar diferentes tipos de células como, por exemplo, fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas, além de possuir tropismo pelas células do sistema nervoso (Hamel *et al.*, 2015; Calvet *et al.*, 2016).

A infecção pelo ZIKV tem como apresentação clínica febre branda, cefaleia, artralgia, *rash* maculopapular com prurido ou não e conjuntivite não purulenta em alguns casos (Luz, Santos, & Vieira, 2015; para revisão ver Zanluca e dos Santos 2016). Embora estes sinais e sintomas sejam considerados moderados, ainda se faz necessário compreender o aumento tão expressivo de manifestações graves da doença.

Além disso, casos incomuns de surtos de doenças desmielinizantes inflamatórias do sistema nervoso periférico (SNP), tais como a síndrome de Guillain-Barré (SGB), têm sido associados à infecção pelo ZIKV em diferentes países do Hemisfério Sul e América Central (Araujo, Ferreira, e Nascimento 2016; Brasil *et al.* 2016; Oh *et al.* 2018; Parra *et al.* 2016; Volpi *et al.* 2018).

Como supracitado, associado à infecção pelo ZIKV houve também o crescimento de casos de doenças neurodegenerativas como a SGB, uma doença neurodegenerativa rara que

acomete células nervosas (Musso, Nilles, e Cao-Lormeau 2014). Geralmente a ocorrência da SGB é maior em indivíduos adultos, onde a resposta imune ativada de forma exacerbada passa a reconhecer antígenos próprios localizados nos axônios dos neurônios (Esposito e Longo 2017). Esse reconhecimento desencadeia destruição das bainhas de mielina e dos axônios. Como consequência desse processo, os indivíduos portadores dessa síndrome desenvolvem neuropatia periférica aguda, com associação de astenia e hiporreflexia (Li *et al.* 2018).

À vista dessas características, se faz necessário entender as complicações clínicas causadas pela infecção de células nervosas pelo ZIKV. No entanto, existe uma escassez de modelos experimentais que possam elucidar a relação entre o ZIKV e o sistema nervoso periférico (SNP). Assim, estudos *in vitro* podem ser ferramentas importantes para a compreensão destas complicações neurológicas. Uma alternativa para esses estudos é o uso de células neurônio-like, como as células PC-12.

1.2. Células PC-12

A linhagem de células PC-12 é composta por células clonais noradrenérgicas provenientes de feocromocitoma de ratos da espécie *Rattus norvegicus*. Atualmente são utilizadas como modelo *in vitro* de estudos sobre função, desenvolvimento e diferenciação neuronal, sinalização intracelular e também em estudos de neurotoxicidade (Greene & Tischler, 1976; Li *et al.* 2017).

As células PC-12 apresentam fenótipo diferente quando são estimuladas com o fator de crescimento do nervo (NGF). Elas diferenciam-se em células neurônio-like, cessando a sua divisão celular, alterando a sua morfologia com o desenvolvimento de neuritos, como se pode observar na **Figura 2**, além de tornarem-se células eletricamente excitáveis (Greene & Tischler, 1976; Jancso, Kiraly, e Jancso-Garbor 1977). Isso é possível porque estas células compartilham a mesma origem embriológica que neurônios (células cromafins) (Unsicker *et al.* 2005).

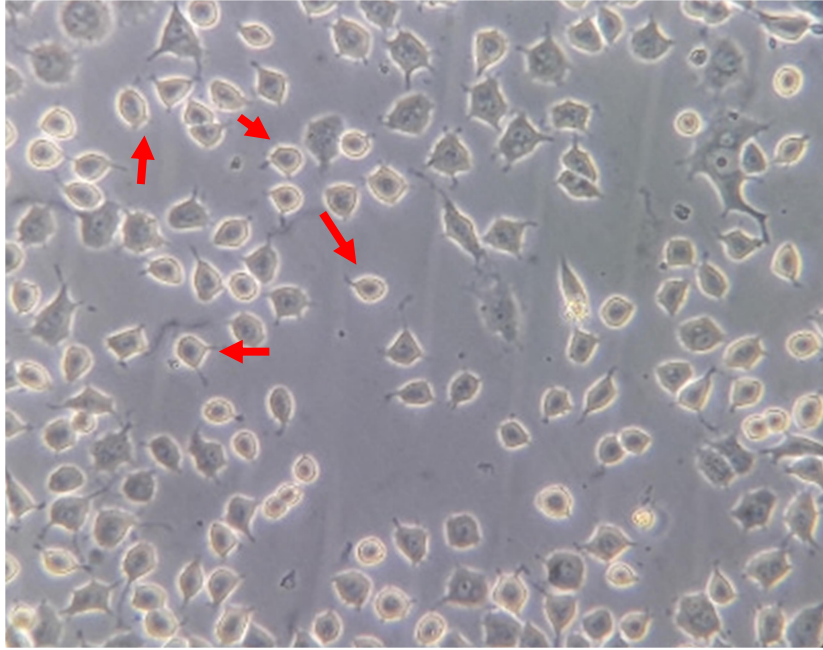


Figura 2. Fotomicrografia de fase de células PC-12, visão geral. Neuritos em crescimento. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 200X). As setas em vermelho indicam neuritos. Imagens representativas. Fotos feitas pelo autor.

Desse modo, levantou-se a hipótese de que as células PC-12 poderiam ser utilizadas como modelo de infecção dos neurônios pelo ZIKV, ideia reforçada pelo estudo de Li e colaboradores (2017), que averiguaram a relação entre o tropismo de outro vírus da família Flaviridae, o vírus da encefalite japonesa (JEV), e a capacidade de infectar células PC-12 diferenciadas.

Quando essas células estão diferenciadas, desenvolvem neuritos, definido como qualquer extensão ou projeção celular formada por neurônios ou células neurônio-like *in vitro* (Jacovina *et al.*, 2001; Ferreira *et al.* 2016). Assim, o estudo da neuritogênese pode representar uma alternativa para avaliar mudanças induzidas pelo ZIKV no Sistema Nervoso Periférico, sobretudo em virtude desse processo já estar bem elucidado na literatura.

1.3 Neuritogênese

A neuritogênese ou iniciação neuronal é o principal evento da morfogênese neuronal, sendo crucial para a formação, remodelamento, desenvolvimento de sinapses neuronais, resposta a lesões e à regeneração (Ferreira *et al.* 2016; para revisão ver Flynn 2013; Xu *et al.* 2008). Esse processo ocorre em três etapas: protrusão, ingurgitamento e consolidação, como representado na **Figura 3** (Wasilewska-Sampaio,2005; para revisão ver Flynn, 2013).

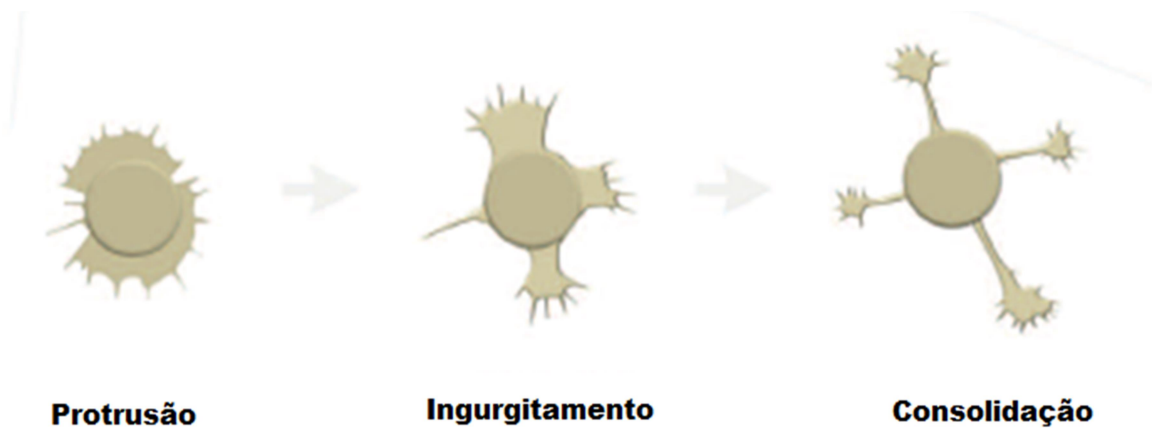


Figura 3. Fases da neuritogênese ou iniciação neuronal. O processo de neuritogênese ocorre durante o desenvolvimento neuronal, sendo subdividido em três etapas. Inicialmente ocorre o deslocamento dos lamelipódios e filopódios, posteriormente na etapa denominada de ingurgitamento tem-se a migração de microtúbulos e outros componentes para a periferia dos filopódios e lamelipódios. Na última etapa, ocorre a formação de neuritos na base do cone de crescimento. Adaptada de Flynn, 2013.

A primeira etapa denominada de protrusão ocorre baseada nos rearranjos e polimerização de F-actina, desencadeando a expansão da membrana plasmática. Posteriormente, ocorre a etapa de ingurgitamento, que consiste no avanço de neurofilamentos e concomitantemente ocorre o transporte de organelas e vesículas para periferia dos neuritos em formação e por fim, na consolidação ocorre o colapso da membrana e do citoesqueleto originando o neurito (para revisão ver Flynn, 2013).

A maturação e o alongamento dos neuritos possibilitam a formação de conexões entre os neurônios e essas possibilitam o correto funcionamento do sistema nervoso (para

revisão ver Valtorta & Leoni, 1999; Jacovina *et al.*, 2001; para revisão ver Flynn, 2013; Ferreira *et al.* 2016). A maturação e alongamento dos neuritos faz parte da neuritogênese, processo na qual utiliza-se fatores de crescimento, como por exemplo, o NGF, usado tanto em modelos *in vitro* quanto em modelos *in vivo* para estimular a diferenciação neuronal e consequentemente alterações (Levi-Montalcini, 1987; para revisão ver Valtorta e Leoni 1999).

As alterações morfológicas ou funcionais provenientes da neuritogênese possuem mecanismos complexos de regulação que são principalmente mediados por estruturas conhecidas como cones de crescimento. Essa é uma estrutura altamente especializada e é responsável pelo crescimento e desenvolvimento neuronal e pela manutenção das funções neuronais (Meiri, Pfenninger, & Willard, 1986; Boczek, Ferenc, Lisek, & Zylinska, 2015). Nessas extremidades, encontra-se uma elevada expressão de genes neuronais específicos, como o alvo desse estudo, a GAP-43 (Liu, Wang, & Lu, 2015).

1.4 Proteína associada ao crescimento (GAP-43)

A proteína associada ao crescimento GAP (do inglês, *growth associated protein*), é sintetizada no corpo celular neuronal e desempenha a sua função nas extremidades dos neuritos (Meiri, Pfenninger, & Willard, 1986; Boczek, Ferenc, Lisek, & Zylinska, 2015). As GAPs possuem propriedades básicas relacionadas ao crescimento axonal e à neuroplasticidade, coordenando mudanças na estrutura e função axonal (para revisão ver Holahan, 2017). Além dessas propriedades, essas proteínas também estão relacionadas à regeneração celular, como observado por Skene e Willard (1981a), onde verificaram que a ausência de recuperação de alguns neurônios após lesão pode ser resultado da sua incapacidade de indução proteica de GAPs.

Existem diferentes proteínas GAP e a GAP-43, com peso molecular de 43 kDa foi primeiramente observada em olhos de coelhos (Willard *et al.*, 1974). Posteriormente, Zwiers *et al.* (1976) mostraram sua presença em cérebro de ratos e mais adiante no nervo óptico de cobaias e sapos (Levine e Willard, 1980, Skene and Willard, 1981 a,b). Essa proteína é expressa nos cones de crescimento e também é denominada como F1, neuromodulina, B-50, G50 e pp46 (para revisão ver Holahan, 2017). Atualmente sabe-se que está presente em

células neuronais e está relacionada com a regulação da sinalização pré-sináptica, com o crescimento e com a plasticidade axonal, através de propriedades bioquímicas e interações com várias outras proteínas pré-sinápticas (para revisão ver Holahan, 2017).

Sua expressão varia de acordo com a fase de desenvolvimento do sistema nervoso. Durante o período perinatal os níveis de expressão gênica da GAP-43 no SNC são mais acentuados, porém, sua expressão tende a diminuir gradativamente com o amadurecimento do SNC (para revisão ver Holahan, 2017). Entretanto, em locais passíveis de sofrerem plasticidade, tais como cerebelo, hipocampo, medula espinhal e o tronco encefálico (principalmente em áreas com moderada mielinização), as concentrações de GAP-43 permanecem elevadas (Kapfhammer & Schwab, 1994; Casoliet *al.*, 2001).

Apesar de haver diferença entre os neurônios no SNP e no SNC em relação à capacidade de regeneração dos axônios, a expressão de GAP-43 e o crescimento de neurônio são essencialmente similares em ambos (para revisão ver Benowitz e Routtenberg, 1997). O estudo de Biffo e colaboradores (1990) demonstrou que no SNP de rato, é possível detectar a presença do mRNA do GAP-43 nos gânglios da raiz dorsal (GRD) após sua divisão celular, a partir do 10º dia de vida do embrião.

Funcionalmente, a GAP-43 parece ser regulada por dois mecanismos distintos: modificações pré-transcricionais (por exemplo, a regulação através do mecanismo de *helix-loop-helix*) e modificações pós-transcricionais (através da atuação da Calmodulina - CaM e fosforilação mediada pela proteína-quinase C – PKC) (para revisão ver Holahan, 2017).

A GAP-43 é um marcador neuronal associado ao crescimento de neuritos, é expressa em células PC-12, demonstrando uma elevada síntese e transporte axonal durante a regeneração axonal (Frey *et al.* 2000; X. Liu *et al.* 2015; Mishra, Gupta, e Banerjee 2016).

É descrito na literatura que há envolvimento da GAP-43 no desenvolvimento de neuritos, principalmente por haver uma regulação da neuritogênese através de sinais provenientes da matriz extracelular, sendo esse sinal responsável pela sucessão de eventos que regulam o desenvolvimento de neuritos (Al-jahdari, Saito, Nakano, & Goto, 2006).

A relação entre a GAP-43 e neuropatia periférica já está descrita na literatura. Estudos conduzidos por Scott e colaboradores (1999) estimaram um aumento na expressão de GAP-43 em nervos periféricos em pacientes diabéticos, e também foram encontrados indícios de alterações morfológicas provenientes de regeneração ou reparo, fato esse que foi corroborado através de ensaio de imunorreatividade realizado no estudo de Scheytt e colaboradores (2015) que verificaram que a expressão de GAP-43 em pacientes com

neuropatias periféricas em fase inicial é acentuada, indicando um potencial mecanismo de regeneração.

Além disso, os estudos de Xue colaboradores (2008) e Sanna e colaboradores (2016) reforçam esse mecanismo de regeneração e reparo, onde foi notado um aumento na expressão de mRNA de GAP-43 quando existe lesões ou danos axonais durante o desenvolvimento e regeneração no SNP e do SNC.

Assim, sabendo que o ZIKV induz a SGB e que na literatura há descrição de alterações na expressão gênica de GAP-43 em neuropatias, modelos que utilizem as células PC-12 para avaliar infecções por vírus da família Flaviviridae podem ser uma alternativa interessante. A avaliação de alterações no crescimento de neuritos e na expressão do gene para a proteína GAP-43 em estudos com o ZIKV poderia ser relacionada com os sintomas observados na neuropatia periférica presente na SGB, visto que há uma diversidade de estudos que demonstram a ligação da GAP-43 com a neuropatia periférica (Xue *et al.* 2008; Donnelly *et al.* 2011; Sanna *et al.* 2016; Merianda *et al.* 2017; Xie, Strong, e Zhang 2017).

Assim, quantificar mRNA de GAP-43 pode ser uma ferramenta interessante de avaliação dos efeitos causados pelo ZIKV *in vitro*. A partir dessa presunção, nossa hipótese é que a infecção pelo ZIKV em células PC-12 diferenciadas resulte em uma elevada expressão da GAP-43, visto que essa proteína é uma marcadora de plasticidade neuronal.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente a epidemia de Zika vírus (ZIKV) é menor em comparação ao seu ano de maior ocorrência, 2015, onde foi observado um aumento incomum da incidência do número de casos de microcefalia e síndrome de Guillain-Barré (SGB), sequelas neurológicas graves em crianças e adultos, respectivamente. Entretanto, ainda é necessário compreender os mecanismos do estabelecimento destes sintomas neurológicos e como o vírus se relaciona com o sistema nervoso periférico ou central. Porém, existe uma escassez de modelos experimentais *in vitro* para estudar os efeitos neurológicos periféricos da infecção pelo ZIKV.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Caracterizar a expressão gênica de GAP-43 como ferramenta para análise de neurotoxicidade induzida pelo ZIKA Vírus em células PC-12.

Objetivos específicos

- Avaliar a influência de fatores de adesão na cultura de células PC-12.
- Avaliar a expressão gênica de GAP-43 em cultura de células PC-12;
- Avaliar a infecção das células PC-12 pelo ZIKV;
- Avaliar se a infecção pelo ZIKV induz alterações na expressão gênica de GAP-43 em células PC-12 diferenciadas.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

Para a realização do presente trabalho foram utilizados poli-L-lisina (PLL), colágeno IV, penicilina, estreptomicina, fator de crescimento do nervo (NGF), ácido hidroxietil piperazina etanosulfônico (HEPES), dimetil sulfóxido (DMSO), L-glutamina, piruvato de sódio, TRI Reagent[®], clorofórmio, isopropanol, etanol, dicarbonato de dietila (DEPC) e Kit DNase AMPD1, que foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (*Oakville, ON, Canadá*). Também foi utilizado soro fetal bovino (SFB), soro de cavalo (HS), meio de cultura RPMI 1640, meio de cultura F12, que foram adquiridos da empresa Gibco[®], Life Technologies (*Carlsbad, CA, EUA*). O Kit Power SYBR Green-to-Ct ONE STEP usado nos ensaios de quantificação de RNA mensageiro, kit High-Capacity cDNA Archive, o kit TaqMan[®] Gene Expression Master Mix, as placas MicraAmp[®] de 96 poços e os MicroAmp[®] 8-Tube Strips foram adquiridos da empresa Applied Biosystems (*Foster City, CA, EUA*). Utilizou-se também água livre de RNase, adquirida da empresa Ambion[®] (Life Technologies – *Austin, TX, EUA*). Todos os *primers*, bem como a sonda para a detecção do ZIKV utilizados nesse trabalho foram obtidos da empresa IDT[®] (Integrated DNA Technologies, *Coralville, IA, EUA*).

4.2 Células

As células PC-12 (ATCC[®] CRL-1721[™]) utilizadas nesse trabalho foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Antônio Cardoso dos Santos, do Departamento de Toxicologia da Faculdade da Farmácia da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto. Essas foram cultivadas inicialmente em garrafas de cultura com meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 17,86 mM de bicarbonato de sódio, 25 mM de glicose, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio, 50 µg/mL de estreptomicina e 50 UI/mL de penicilina, 5% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de soro de cavalo (HS), neste trabalho denominado de como meio completo (MC).

Para os ensaios de diferenciação, utilizou-se o meio de diferenciação (MD) composto de meio F12, suplementado com 1mM de piruvato de sódio, 1% de soro de cavalo, 50 µg/mL de estreptomicina e 50 UI/mL de penicilina. O crescimento de neuritos nas células PC-12, que caracteriza a diferenciação dessa célula em células neurônio-*like*, foi induzido mediante ao acréscimo do fator de crescimento do nervo (NGF) ao meio de diferenciação (MD) nas concentrações de 100 ng/mL ou 200 ng/mL.

As células foram semeadas inicialmente em garrafas de cultura de área de crescimento de 75 cm² (T-75) ou 175 cm² (T-175), sendo que o meio de cultivo foi trocado a um intervalo de dois dias. Essas células ao atingirem uma confluência de aproximadamente 70%-80% na garrafa eram transferidas para placas de 24 poços tratadas 24h previamente com diferentes fatores de adesão (PLL na concentração de 0,1 mg/mL ou colágeno IV na concentração de 0,1 mg/mL), semeadas em densidade aproximada de 2×10^5 células por poço com meio RPMI 1640 a 37°C com atmosfera com 5% de CO₂.

Posteriormente, para promover diferenciação celular, as células foram submetidas ao MD acrescido de NGF por um período de 24h ou 48h. Durante esse período, as células foram mantidas em incubadora a 37°C com atmosfera com 5% de CO₂. O desenho experimental da placa e as condições usadas para esse experimento estão representados **Figura 4 A e B**.

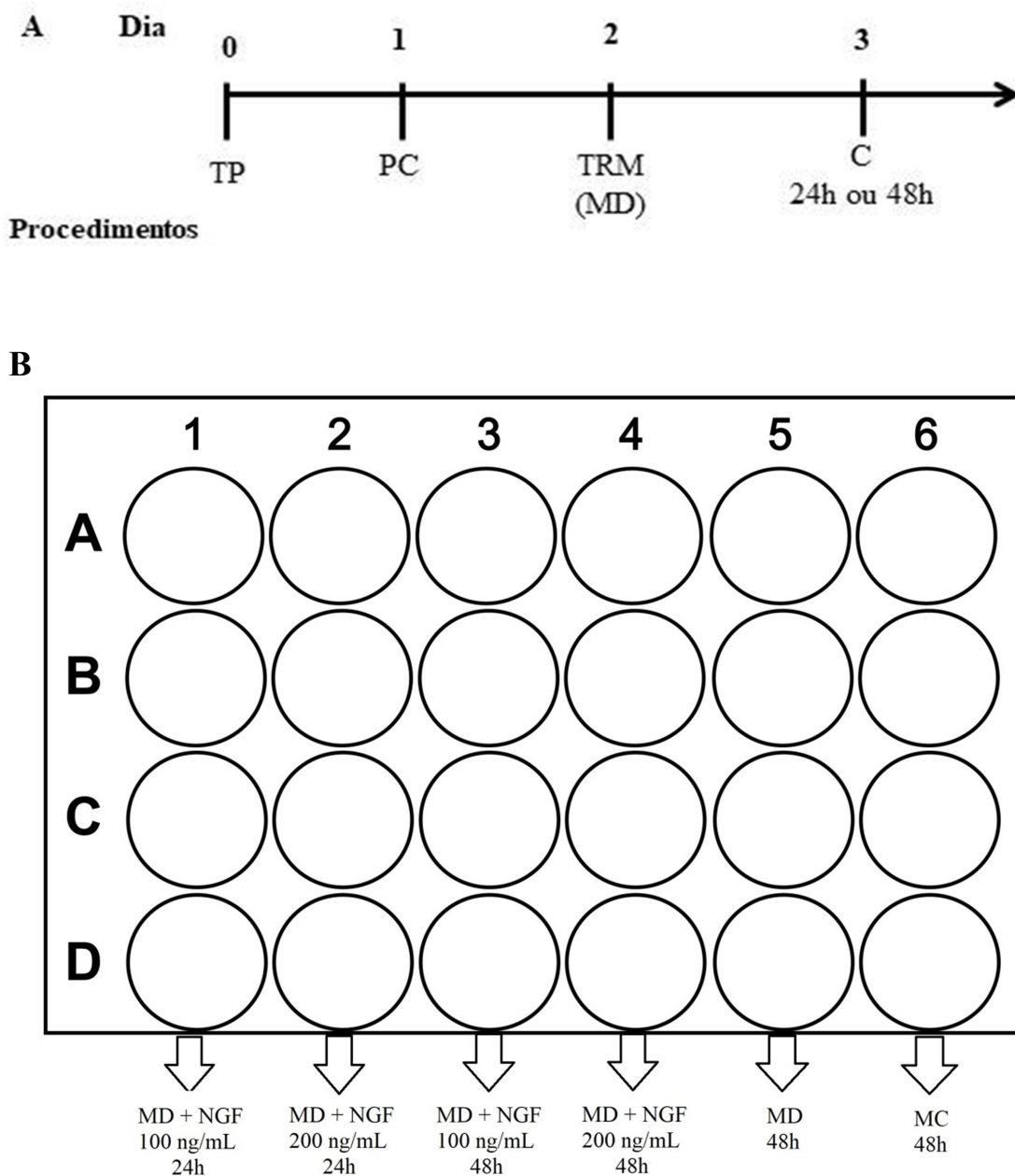


Figura 4. Representação esquemática do desenho experimental do plaqueamento de células PC-12 não infectadas pelo ZIKV e os tratamentos utilizados no plaqueamento. (A): Desenho experimental utilizado para o tratamento de placas em células PC-12 não infectadas pelo ZIKV. TP: Tratamento da placa de cultura com fator de adesão, PC: Plaqueamento celular, TRM: Troca de meio (meio de diferenciação - MD) e C: Coleta das amostras. (B): Após plaqueadas, as células PC-12 foram mantidas em meio RPMI 1640 por 24 horas e posteriormente, o meio RPMI foi retirado e adicionado o meio de diferenciação contendo diferentes concentrações de NGF: as colunas 1 e 3 foram tratadas com 100 ng/mL (24 e 48 horas, respectivamente) e as colunas 2 e 4 200 ng/mL (24 e 48 horas, respectivamente). A coluna 5 foi tratada com o meio de diferenciação sem NGF e por fim, a coluna 6 foi tratada com o meio completo. O experimento foi realizado em triplicata (n=3).

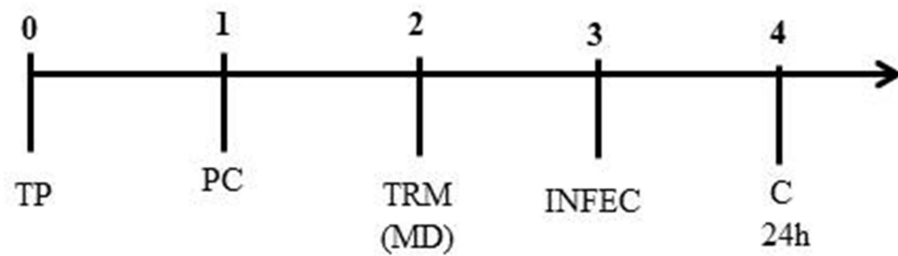
4.3 Infecção pelo ZIKV

A cepa do Zika Vírus utilizada neste trabalho foi coletada de uma paciente naturalmente infectada em Pernambuco e é descrita ZIKV/H. sapiens/*Brazil*/PE243/2015 e abreviado como ZIKV PE243 e foi gentilmente cedido pelo Professor Enrique Roberto Argañaraz do Laboratório de Neurovirologia Molecular (Viromol) na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (FS/UnB).

A cepa do Zika vírus foi submetida à amplificação viral em células VERO e sua titulação foi realizada em células de fibroblastos de rim de hamster (BHK-21). Estes experimentos foram realizados pela equipe da professora Luciana Barros de Arruda do Laboratório de Genética e imunologia das infecções virais (LAGIIVIR) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Para promover infecção do ZIKV, o MOI (multiplicidade de infecção) testado foi de 1. Em função da limitada quantidade de partícula viral, optamos por avaliar apenas as células tratadas com a concentração de 200 ng/mL de NGF. Primeiramente foi realizada a etapa de adsorção viral e para isso, os meios de cultura foram removidos e as células foram lavadas com solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) 1X e expostas ao ZIKV em 500µL de meio MD ou MC (sem soro e antibiótico) por 2 horas, sob agitação leve e em temperatura ambiente. Após o término das 2h, os meios de cultura com ZIKV foram removidos e adicionou-se 300µL de MC e MD Todos os experimentos envolvendo a infecção pelo ZIKV nas células PC-12 foram realizados no Viromol. As variáveis usadas nesse experimento estão representadas na **Figura 5A** e o desenho da placa **Figura 5B**.

A Dia



Procedimentos

B

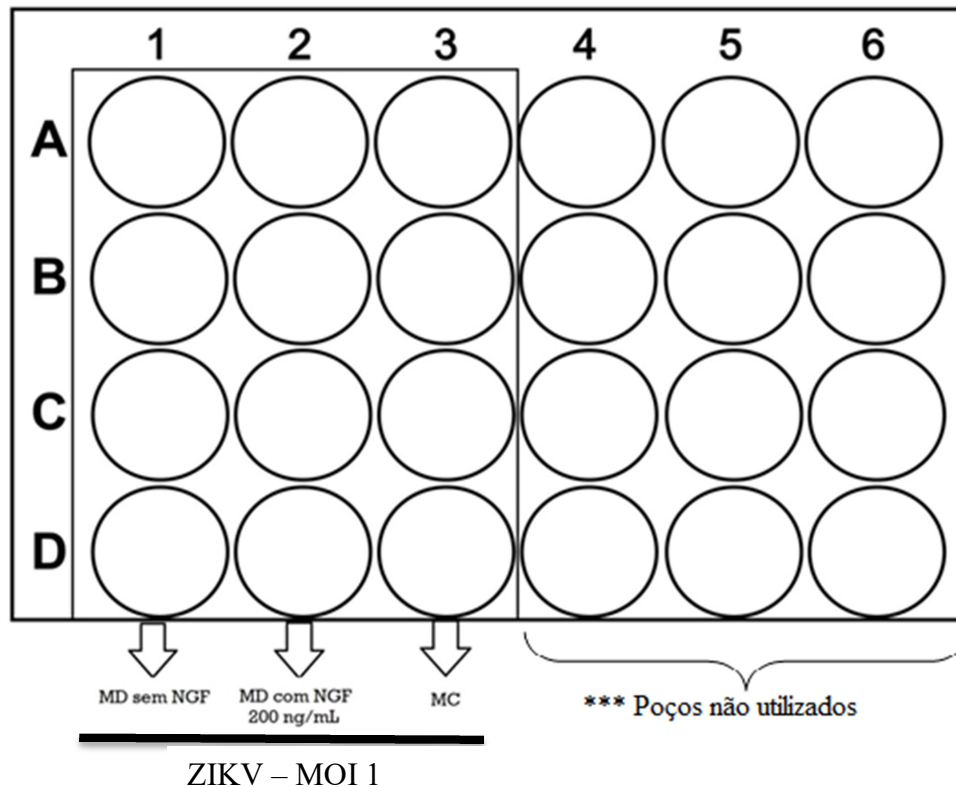


Figura 5. Representação esquemática do desenho experimental da placa utilizada na infecção das células PC-12 pelo ZIKV e os tratamentos utilizados no plaqueamento. (A): Desenho experimental utilizado para o tratamento de placas em células PC-12 infectadas pelo ZIKV. TP: Tratamento da placa de cultura com o fator de adesão celular, PC: Plaqueamento celular, TRM: Troca de meio (MD), INFEC: Infecção com o ZIKV e C: Coleta das amostras. (B) As células PC-12 foram mantidas em meio MC por 24 horas e, posteriormente, os meios foram retirados e adicionados os meios incompletos contendo o ZIKV. Após duas horas, os meios foram substituídos, conforme a seguir: diferenciação sem NGF (coluna 1), meio MD contendo 200 ng/mL de NGF coluna 2 e MC na coluna 3. O experimento foi realizado em triplicata (n=3).

4.4 Isolamento do material genético

Para os ensaios de RT-PCRq, as células e os sobrenadantes foram coletados com o TRI Reagent[®], de acordo com as normas padronizadas pelo fabricante. Para isso, o meio de cultura das células foi removido e cada poço da placa foi lavado com a solução (PBS) 1X a 37°C. As amostras foram coletadas utilizando 1 mL de TRI Reagent[®] por tratamento, sendo mantidas em banho-de-gelo durante todo o processo. Ao final, as amostras foram transferidas para tubos cônicos livres de RNase. Para isolar o mRNA das amostras, foi realizado o método de extração isopropanol-clorofórmio, onde primeiramente foi realizada a separação da fase inorgânica e orgânica por meio da adição de 200 µL de clorofórmio por mL de TRI Reagent[®] utilizado na etapa anterior. Em seguida as amostras foram homogeneizadas em vórtex durante 15 segundos e incubadas em temperatura ambiente por 3 minutos e, em então, centrifugadas a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Assim, formaram-se três fases: vermelha (inferior – proteína), branca (intermediária – DNA) e incolor (superior – RNA). Essa última foi transferida para outro tubo de 1,5mL livre de RNase. Nesse, foi acrescido a cada amostra 500 µL de isopropanol, para promover a precipitação do RNA. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e posteriormente foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Ao término do processo o sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* formado foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado, para lavagem do *pellet*. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 9.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos vertidos sobre gaze estéril para a secagem dos *pellets*, que foram ressuspensos em 11 µL de água Livre de RNase.

4.5 Tratamento com DNase

Para evitar contaminações do RNA com DNA genômico e conseqüentemente prevenir erros na avaliação da expressão gênica, as amostras de RNA foram tratadas com a enzima desoxirribonuclease (*DNase*) utilizando o *kit DNase-AMPDI* como estabelecido pelo

fabricante. Assim, amostras contendo até 1 µg de RNA total foram tratadas com 1 unidade/µL de DNase I para um volume final de 10 µL a temperatura ambiente pelo período de 15 minutos, após o término desse tempo, acrescentou-se 1 µL de tampão de inativação (*Stop solution*), que continha ácido etilenodiaminotreta-acético (EDTA- 50 mM, pH 8,0), para a inativação química da enzima. O EDTA é responsável pela quelação de minerais, tais como o magnésio e o cálcio (cofatores fundamentais para o funcionamento da enzima). Logo depois da inativação química da DNase, as amostras foram incubadas a 70°C por 10 minutos com o auxílio do termociclador (*Biorad, Hercules, CA, EUA*), para realização da desnaturação dessa enzima. Para a conservação das amostras, as mesmas foram mantidas em *freezer* a -80°C, até a sua utilização na RT-PCRq.

A partir do tratamento das amostras com a DNase, foi realizado posteriormente o teste para avaliar o grau de pureza e a quantificação do RNA das mesmas através da técnica de espectrometria óptica, com auxílio do aparelho NanoVue Plus (*GE Healthcare, Life Sciences, Buckinghamshire, UK*), utilizando 1 µL de amostra. O equipamento fornece instantaneamente a concentração de RNA (µg/µL) que é determinada pelo seguinte cálculo: $(DO\ 260\ \text{nm} \times 40)/1000$, em que DO 260 representa o valor da densidade óptica da amostra determinada no comprimento 260.

4.6 Análise da expressão gênica de GAP-43

A expressão gênica da GAP-43 foi avaliada através da síntese de DNA complementar (cDNA), seguida pela transcrição reversa (RT) e posteriormente pela amplificação pela reação em cadeia da polimerase em tempo real e quantitativa (RT-PCRq). Primeiramente, foi necessário realizar a validação dos *primers* da GAP-43 e β-actina nas células PC-12.

Os *primers* da β-actina e *Gap-43* foram obtidos da literatura e fornecidas pelo IDT[®] (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA). Os critérios adotados para sua escolha consistem na porcentagem de guanina e citosina (GC) (entre 30% e 60%), quantidade de pares de base (pb - entre 18 a 23), gerar um *amplicon* (produto amplificado) de até 150 pb e a temperatura de anelamento em torno de 60°C.

Com o intuito de analisar a especificidade dos *primers*, utilizou-se como banco de dados a *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. As seqüências dos *primers* estão descritas no **Quadro 1**.

Quadro 1. Relação dos pares *primers* utilizados durante o processo de PCR quantitativa em tempo real (PCRq-RT) para quantificação gênica de *Gap-43*.

<i>Primer</i>	Seqüência	pb	Referência
β -actina	F: 5'-AGGGAAATCGTGCGTGACAT-3'	20	Z. Y. Li <i>et al.</i> , 2016;
	R: 5'-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3'	20	
Gap-43	F: 5'-AAGGCAGGGGAAGATACCAC-3'	20	Z. Liu <i>et al.</i> , 2015
	R: 5'-TTGTTCAATCTTTTGGTCCTCAT-3'	23	

Uma vez determinados os pares de primers, foi realizada a validação dos mesmos. Para que eles fossem validados, deveriam conter as seguintes especificações: eficiência de amplificação entre 90% e 110% ($100\% \pm 10$), com o coeficiente de correlação (r^2) maiores do que 0,99 e com valor de inclinação da reta com o valor próximo a -3,32 ($-3,32 \pm 0,2$). A para isso foi elaborada uma curva de diluição, denominada de curva-padrão, onde as concentrações de RNA foram previamente determinadas. Assim, a concentração do primeiro ponto foi de 20 ng de RNAt (*primers* da Gap-43), que foram diluídos em 4,5 μ L de água livre de RNase, com fator de diluição de 5. Os *primers* de β -actina foram validados anteriormente com fator de diluição igual a 5, no entanto com a concentração inicial da curva de 10 ng de RNA. A concentração dos *primers* usada para a sua validação (10 μ M) foi baseada em dados anteriores de trabalhos realizados pelo nosso grupo.

A aferição dos valores foi obtida a partir do equipamento *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* modelo AB7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) e analisadas no programa *StepOne* versão 2.3. com os seguintes parâmetros: programa de transcrição reversa (48°C por 30 minutos), ativação da Taq DNA polimerase: (95°C por 10 minutos), 40 ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação (95°C por 15 segundos para desnaturação, 60°C por 1 minuto para o anelamento e extensão).

Além dos parâmetros citados acima, foi elaborada a curva de dissociação denominada de curva de *melting*. Para tanto, as amostras utilizadas foram submetidas ao aquecimento de 60 °C e gradativamente essa temperatura foi aumentada em 0,3°C até 95°C. O processo de aumento da temperatura é responsável pela diminuição da fluorescência, sendo que o ponto equivalente ao decaimento mais acelerado do sinal de fluorescência é nomeado

de temperatura de dissociação (T_m – *melting temperature*) e determina o momento em que o produto de PCR (*amplicon*) apresenta-se 50% em fita dupla e 50% em fita simples. A T_m é específica para cada sequência de DNA amplificada, logo é esperado que apenas um pico de decaimento fosse detectado para cada par de *primer* utilizado. Os dados obtidos foram analisados em um gráfico da razão entre a derivada da fluorescência (dF) e a derivada da temperatura (dT) ($\frac{dF}{dT}$) em relação à temperatura (dados obtidos pelo *software*).

4.6.1 Análise da expressão Gênica por RT-PCRq

Para a análise da expressão gênica de GAP-43 e β -actina foi utilizado o *kit Power SYBR[®] Green RNA-to-CT 1-Step* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) conforme instruções do fabricante. A partir desse método, pode-se quantificar a amplificação do gene de interesse através da quantidade de luz emitida pelo corante *SYBR[®] Green I*, pois o fluoróforo tem a capacidade de se intercalar entre as fitas duplas de DNA e por consequência emitir fluorescência. Mediante ao aumento do produto formado, as intercalações do corante são maiores e, por conseguinte, ocorre uma emissão maior na quantidade de luz, sendo que esse sinal luminoso é convertido para a forma numérica e representado pelo *Cycle threshold* (C_t – Ciclo limiar, em tradução livre).

As reações de amplificação foram realizadas em placas de *MicroAmp[®]* de 96 poços, livres de DNA, RNA e RNase, com volume de 0,1 mL. Para tal, cada reação possuía volume final de 10 μ L, sendo 5,5 μ L de mix da reação e 4,5 μ L de amostra, as quantidades em volume dos componentes utilizados na reação estão descritas no **Quadro 2**. A água foi usada como controle negativo dos experimentos em substituição da amostra e os demais componentes presentes nas reações foram mantidos.

Quadro 2. Relação dos reagentes usados por reação nos experimentos de RT-PCRq.

Componente de Reação	Volume
Água livre de RNase	0,02µL
Mix da Enzima Transcriptase Reversa (125X)	0,08 µL
<i>Forward primer</i> (200 nM)	0,20 µL
<i>Reverse primer</i> (200 nM)	0,20 µL
mRNA (10 ng)	4,5 µL
Mix <i>Power SYBR® Green</i> RT-PCR (2X)	5 µL
Volume final	10 µL

Todos os resultados foram obtidos por intermédio do equipamento *StepOne Plus* modelo AB7500 e analisados pelo programa *Software StepOne* versão 2.3. Os valores determinados como C_t foram normalizados a partir do controle endógeno, a β -actina. Para isso, o C_t dos genes alvos foi retirado do C_t da β -actina, para posteriormente ser analisada a expressão relativa dos genes baseado na comparação entre C_t e $\Delta\Delta C_t$. O valor da expressão relativa do gene será dado pela equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ amostras - ΔC_t calibrador, sendo o calibrador a amostra tratada com veículo (Livak e Schmittgen 2001).

4.6.2 Detecção e Análise da expressão gênica do vírus por RT-PCRq

A infecção pelo Zika vírus foi avaliada através da quantificação do RNA viral nas células PC-12 e também no seu sobrenadante, por meio da técnica de RT-qPCR. Para a análise do RNA viral, as células PC-12 e o seu sobrenadante foram recolhidos e submetidos à extração de RNA total pelo método de fenol clorofórmio, utilizando o reagente TRI Reagent® de acordo com as normas padronizadas pelo fabricante.

Para realizar o ensaio de transcrição reversa do mRNA, foi padronizado o uso de 900 ng do RNA proveniente das células. Para a RT-PCR dos RNAs extraídos dos sobrenadantes, que não são quantificados, foi utilizado o volume máximo de RNA estipulado pelo fabricante para reação, que é de 10 µL. A esse material, foi misturado a 10 µL do mix do kit *High-Capacity cDNA Archive Kit*, utilizando oligonucleotídeos iniciadores randômicos seguindo o

protocolo do fabricante, usando os seguintes parâmetros no termociclador (Applied Biosystems): 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e manter as amostras na temperatura de 4°C ao término do processo.

Para a detecção e quantificação viral, foram utilizados os *primers* e a sonda específica para o ZIKV da empresa IDT descritas no **Quadro 3** (Lanciotti *et al.* 2008). O Kit composto pela sonda e par de *primers* foi ressuspendido em tampão TE (Tris 10 mM + EDTA 1 mM, pH = 8,0) foi feita a diluição da sonda para uma concentração de 2.5 nM, e dos pares de *primer* de 5 nM, realizado conforme instruções do fabricante.

As reações de amplificação foram realizadas em MicroAmp® 8 tubos Strip, livres de DNA, RNA e RNase, com volume de 0,2 mL. Para tal, cada reação possuía volume final de 10 µL, sendo 5,5 µL de mix da reação e 4,5 µL de amostra de cDNA. Utilizou-se o kit *TaqMan Gene Expression Master Mix* para quantificação do RNA viral através de qPCR, sendo o volume dos componentes utilizados na reação estão descritas no **Quadro 3**.

Quadro 3. Relação dos reagentes usados por reação nos experimentos de RT-PCRq de cDNA.

Componente de Reação	Volume
Mix TaqMan® Gene Expression Master Mix(20x)	5 µL
<i>PrimeTime</i> ® StdqPCR Assay (500 rxn)	0,5 µL
cDNA (200 ng)	4,5 µL
Volume final	10 µL

Todos os resultados foram obtidos por intermédio do equipamento de qPCR QuantStudio 3 (Applied Biosystems), com a seguinte ciclagem: 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos no holding, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os dados da qPCR foram analisados pelo programa QuantStudio™ Design & Analysis Software e GraphPad Prism.

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas deste trabalho foram realizadas com o auxílio do *software Graphpad PRISM* versão 7.0 para *Windows*. A distribuição dos valores das amostras foi considerada não paramétrica e os resultados foram apresentados como média do $n \pm$ erro padrão média (*standard error of the mean* – SEM). Diferenças das médias entre os grupos foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguidos de pós teste de Dunns ou teste de Mann-Whitney unilateral, quando aplicável. Foi adotado como critério de significância o valor de $p < 0,05$. Todas as culturas celulares foram feitas em dias distintos.

5. RESULTADOS

5.1. Padronização dos fatores de adesão utilizados nas culturas de células PC-12.

As células PC-12 em cultura apresentam como característica morfológica a conformação irregular e a formação de *clusters*. Com o objetivo de avaliar a adesão das células PC-12 quando expostas ao meio de diferenciação, foram utilizados os fatores de adesão PLL e colágeno IV. Esses dois fatores de adesão celular foram escolhidos principalmente por serem mais utilizados em estudos de diferenciação celular (Tomaselli, Damsky & Reichardt 1988; Ogra *et al.* 2016). As concentrações de NGF 100 ou 200 ng/mL foram escolhidas por serem concentrações padronizadas por Greene & Tischler (1976) e bastante utilizadas em pesquisas de estímulo de crescimento de neuritos (Orlowska *et al.* 2017).

Nas **Figuras 6 e 7**, observou-se que tanto no tratamento das placas de cultura com PLL, quanto no tratamento com colágeno as células PC-12 aderiam-se aos poços, bem como apresentaram desenvolvimento de neuritos (indicado pelas setas vermelhas). No decorrer dos experimentos, era nítido que os poços tratados com meio completo apresentavam mais células do que os poços tratados com meio de diferenciação. Embora não tenhamos contado o número de células ao final destes experimentos, é possível observar que havia uma maior quantidade de células nos poços submetidos ao MC (**Figuras 6 E e 7 E**).

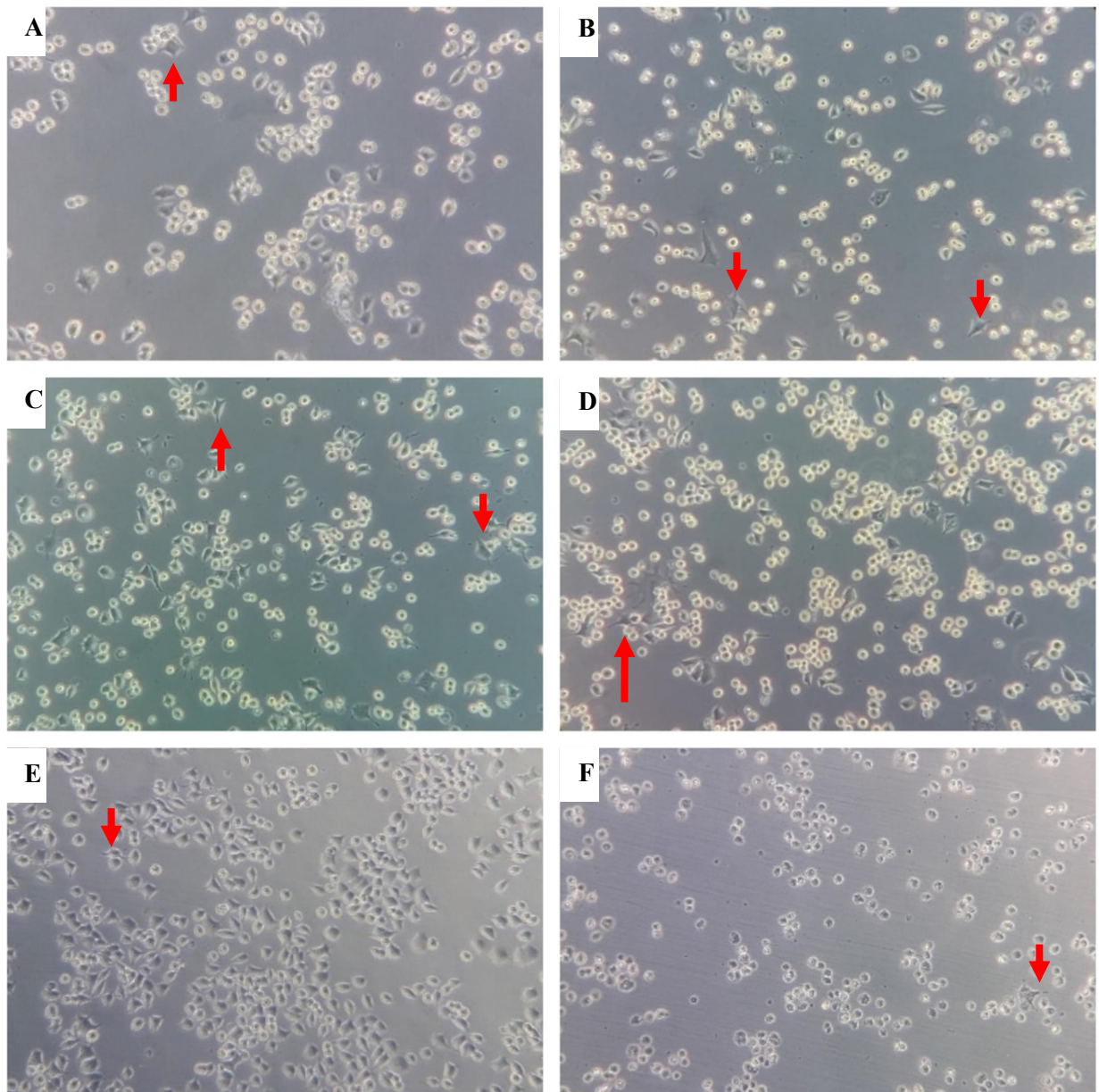


Figura 6. Fotomicrografia de cultura de células PC-12 tratadas com o fator de adesão PLL. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100X). As células foram cultivadas com densidade celular de 2×10^5 células/poço e mantidas a 37°C e 5% de CO_2 em placas tratadas com PLL (0,1 mg/mL) por 24 horas. (A) Células PC-12 tratadas com MD com NGF 100 ng/mL por 24h. (B) Células PC-12 tratadas com MD com NGF 100 ng/mL por 48h. (C) Células PC-12 tratadas com MD com NGF 200 ng/mL por 24h. (D) Células PC-12 tratadas com MD com NGF 200 ng/mL por 48h. (E) Células PC-12 tratadas com MC por 48h. (F) Células PC-12 tratadas com MD sem NGF por 48h. As setas em vermelho indicam neuritos. Imagens representativas de cada estímulo. Imagens realizadas pelo autor.

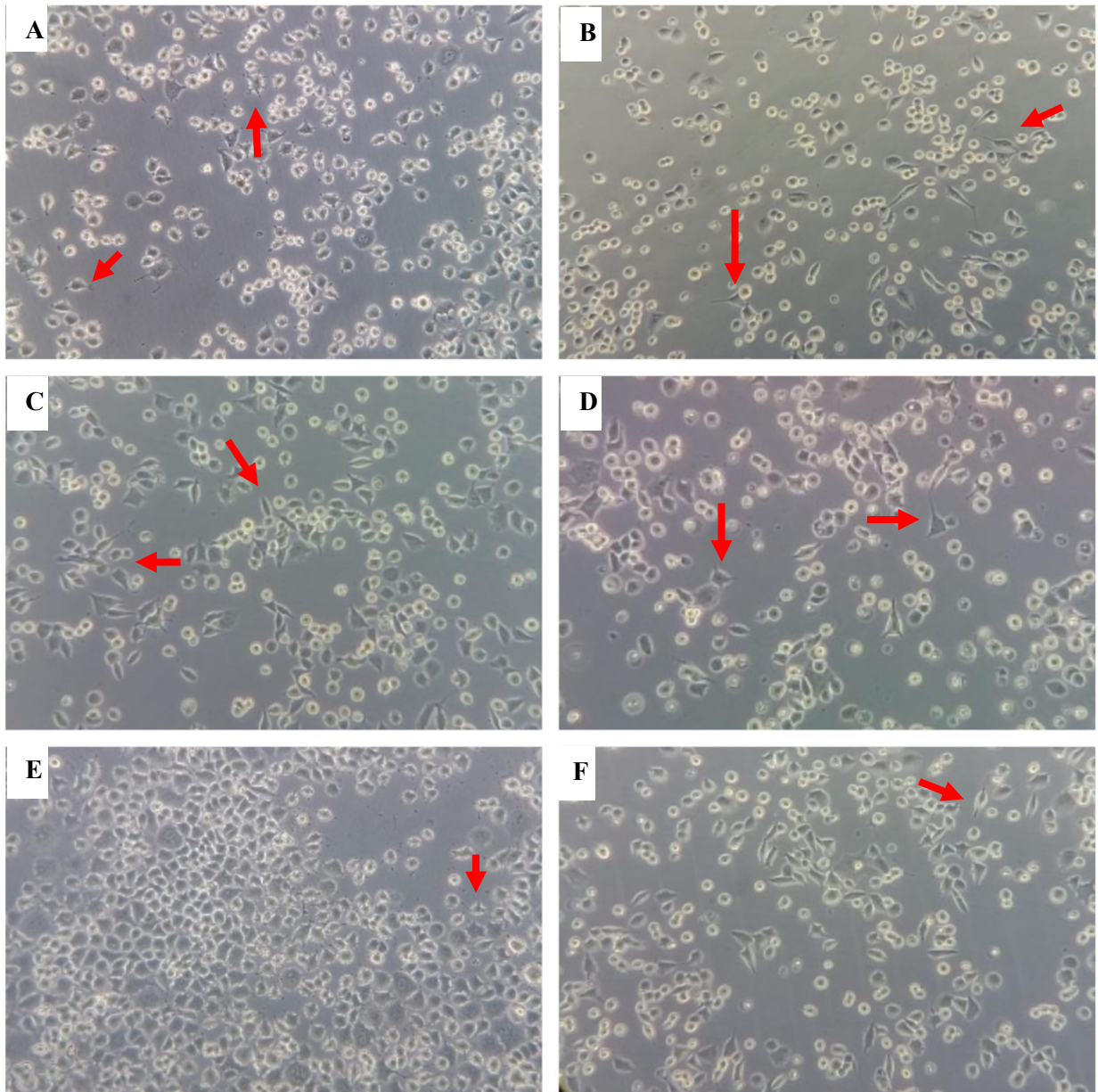


Figura 7. Fotomicrografia de cultura de células PC-12 tratadas com o fator de adesão colágeno IV. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100X). As células foram cultivadas com densidade celular de 2×10^5 células/poço e mantidas a 37°C e 5% de CO_2 em placas tratadas com colágeno IV (0,1 mg/mL) por 24 horas. (A) Células PC-12 tratadas com MD com NGF 100 ng/mL por 24h. (B) Células PC-12 tratadas com MD com NGF 100 ng/mL por 48h. (C) Células PC-12 tratadas com MD com NGF 200 ng/mL por 24h. (D) Células PC-12 tratadas com MD com NGF 200 ng/mL por 48h. (E) Células PC-12 tratadas com MC por 48h. (F) Células PC-12 tratadas com MD sem NGF por 48h. As setas em vermelho indicam neuritos. Imagens representativas de cada estímulo. Imagens realizadas pelo autor.

5.2. Padronização dos *primers* da β -actina e GAP-43.

Com a finalidade de verificar a eficiência e especificidade dos pares de *primer* nas células PC-12, foi elaborada uma curva de amplificação utilizando a técnica de RT-PCRq em tempo real, na qual a eficiência e especificidade dos dois pares de *primers* de GAP-43 e β -actina foram obtidas.

As **Figuras 8 A e C** representam os gráficos de regressão linear das curvas-padrões dos pares de *primers* da β -actina e GAP-43, respectivamente. Os valores obtidos para eficiência relativa, r^2 e inclinação da curva das curvas-padrões satisfazem o uso desses *primers*, conforme descrito no **Quadro 4**.

Quadro 4. Eficiência relativa, r^2 dos pares de *primers* e inclinação da curva-padrão.

Genes	Eficiência (100% \pm10)	r^2 ($>0,990$)	Inclinação (-3,32 \pm0,2)
<i>β-actina</i>	109,013	0,998	-3,123
<i>Gap-43</i>	94,372	0,996	-3,209

Para verificar a especificidade de cada *primer*, foram feitas curvas de *melting* para os dois pares de *primers*. Pode-se notar que ambos os pares de *primers* demonstraram especificidade pelo produto formado, pois apresentam apenas um pico, o que indica a ausência da formação outros produtos ou a formação de dímeros de *primers* (**Figuras 8 B e D**).

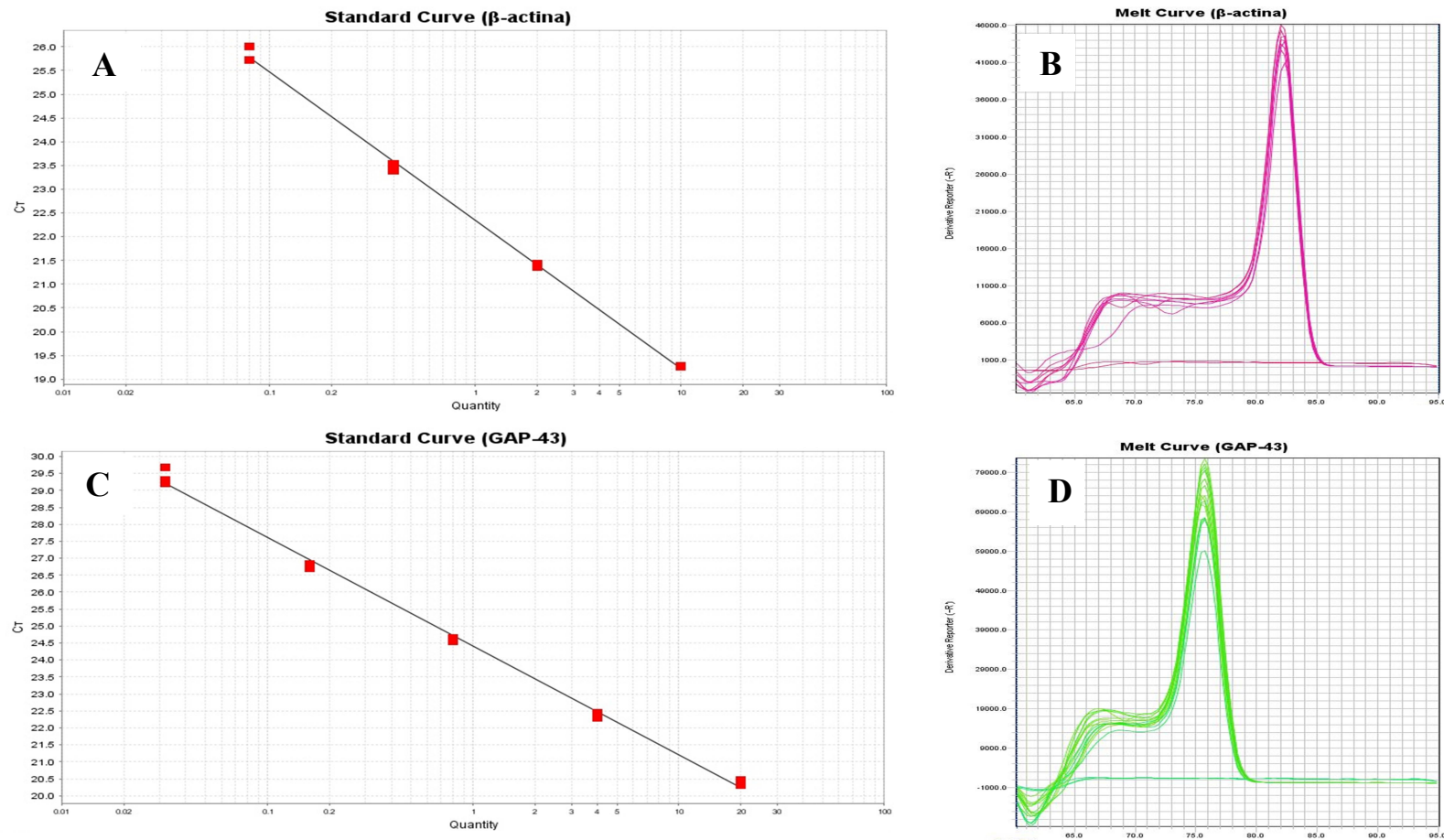


Figura 8. Especificidade e eficiência do primers da β -actina e da GAP-43. A curva-padrão dos primers de β -actina e de GAP-43 foram determinadas com a concentração inicial de 10 e 20 ng de mRNA, respectivamente. A expressão gênica foi estabelecida através da técnica de RT-PCRq em tempo real, onde os resultados foram examinados e representados como regressão linear (A) e curva de *melting* (B) para a β -actina e regressão linear (C) e curva de *melting* (D) para a GAP-43.

5.3 Avaliação do perfil de expressão gênica de GAP-43 em células PC-12 diferenciadas e não diferenciadas.

Para avaliar a expressão de GAP-43 em células PC-12 sob diferentes estímulos, as células foram tratadas com o MC e MD pelo período de 24h ou 48h na presença de NGF na concentração de 100 ou 200 ng/mL. A diferenciação das células com o estímulo de NGF 100 e 200 ng/mL no período de 24 ou 48h não alterou a expressão de mRNA de GAP-43, tanto no tratamento das placas com PLL (**Figuras 9**), quanto nas tratadas com colágeno IV (**Figuras 10**).

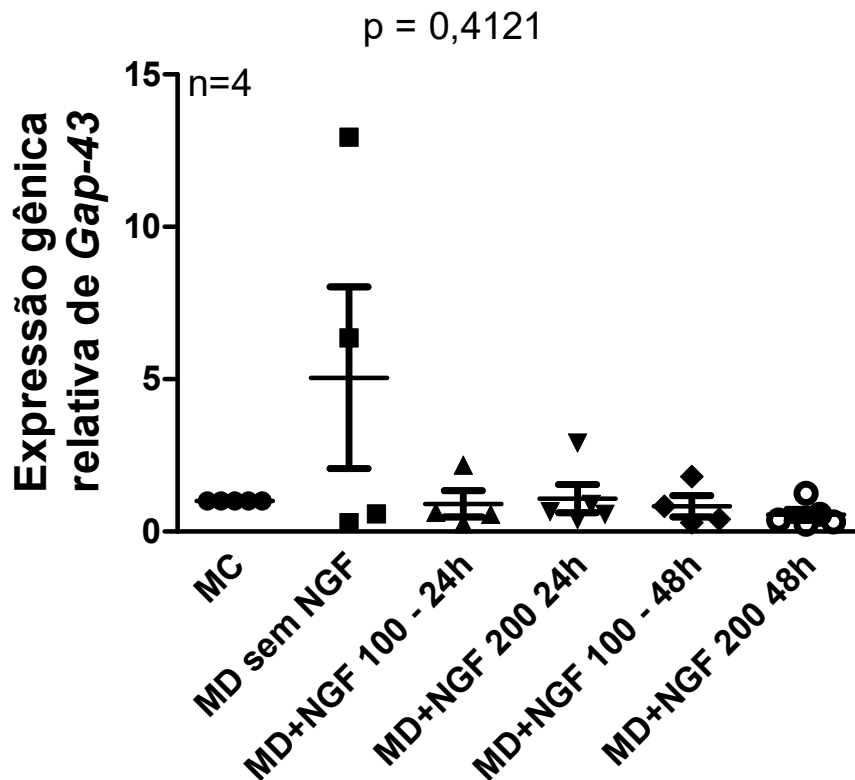


Figura 9. As células PC-12 diferenciadas e não diferenciadas em placas tratadas com PLL não alteram a expressão do mRNA de GAP-43 independente dos tratamentos usados. Foram semeadas 2×10^5 células PC-12/poço, que foram estimuladas com NGF 100 ou 200 ng/mL por 24h ou 48h. A expressão relativa de mRNA de GAP-43 foi determinada por RT-PCRq em tempo real e normalizada pelos valores de β -actina. Os dados foram representados no gráfico dotplot e expressos como média \pm SEM, n= 4 em cada grupo. O valor de p do experimento foi de 0,4121 em relação ao controle em placas tratadas com PLL.

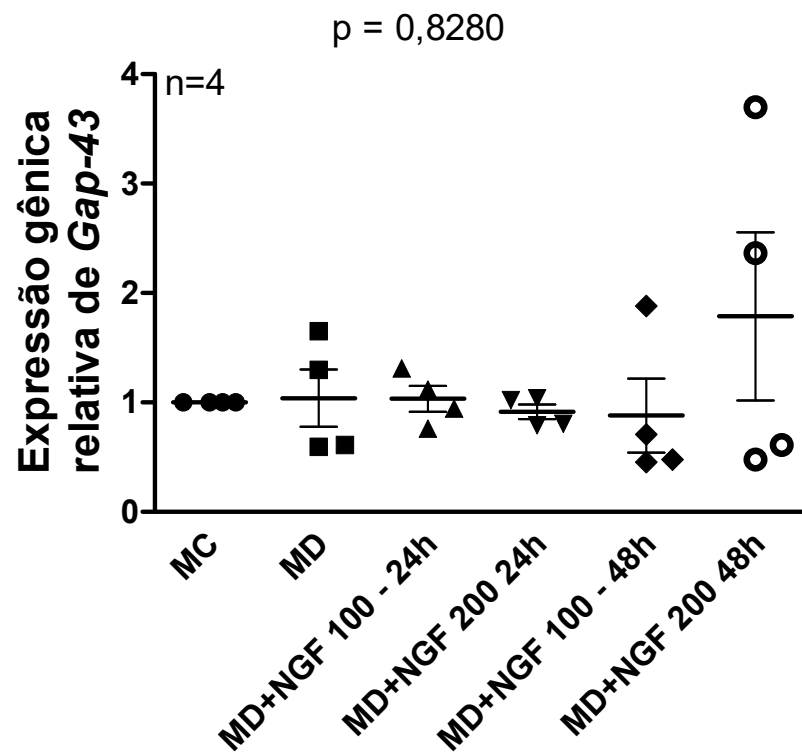


Figura 10. As células PC-12 diferenciadas e não diferenciadas em placas tratadas com colágeno IV não alteram a expressão do mRNA de GAP-43 independente dos tratamentos usados. Foram semeadas 2×10^5 células PC-12/poço, que foram estimuladas com NGF 100 ou 200 ng/mL por 24h ou 48h. A expressão relativa de mRNA de GAP-43 foi determinada por RT-PCRq em tempo real e normalizada pelos valores de β -actina. Os dados foram representados no gráfico dotplot e expressos como média \pm SEM, $n=4$ em cada grupo. O valor de p do experimento foi de 0,8280 em relação ao controle em placas tratadas com colágeno IV.

5.4 As células PC-12 são passíveis de infecção pelo ZIKV.

Para avaliar se o ZIKV infecta as células PC-12, estas foram expostas ao vírus em MOI 1 por duas horas. Em seguida o meio contendo o vírus foi substituído por MC, MD sem NGF e MD acrescido de 200 ng/mL de NGF e e cultivadas por 24 horas. Pode-se observar na **Figura 11** que houve infecção pelo ZIKV nos 3 diferentes estímulos que as células PC-12 foram expostas, e que quando estimuladas com MD + NGF 200 ng/mL havia 34% menos

RNA viral em comparação com o controle. Como controle foi utilizado células PC-12 sem a infecção pelo ZIKV e essas amostras não tiveram a expressão gênica relativa de ZIKV.

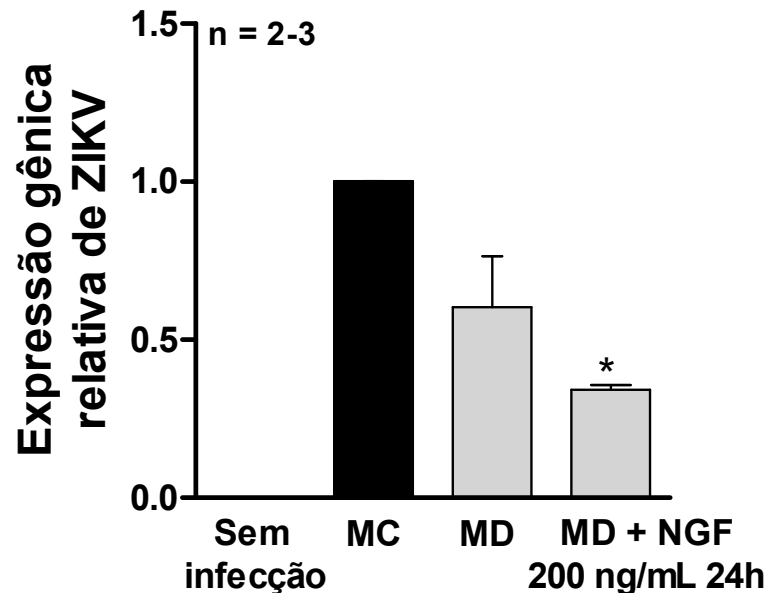


Figura 11. As células PC-12 são passíveis de infecção pelo ZIKV e a expressão do RNA viral é menor quando as células são estimuladas com NGF 200 ng/mL. As células PC-12 foram semeadas em placas de 24 poços com uma densidade de 2×10^5 células/poço pelo período de 24h com tratamentos contendo MD, MD com 200 ng/mL e MC, sendo que adiante as mesmas foram infectadas pelo ZIKV em MOI 1. A expressão relativa de ZIKV foi determinada através de RT-PCRq e normalizada pelos valores de β -actina. Os dados foram expressos como média \pm SEM, n= 2 no tratamento com MD+NGF 200ng/mL 24h e n=3 nos tratamentos com MC e MC. * p< 0,05 vs controle.

Além disso, para analisar a capacidade de replicação do ZIKV, foi analisado se havia material genômico do vírus no sobrenadante 24h após a coleta, sendo que foi detectado RNA viral somente no sobrenadante de duas amostras de MC e em uma amostra de MD (amplificação excedeu o *threshold* estabelecido - **Figura 12 A**), indicando que houve replicação viral nessas amostras. O *threshold* estabelecido foi de 0,03, momento que a fluorescência das amostras alcançou valores exponenciais.

Também foi analisado a especificidade da sonda do ZIKV utilizada neste trabalho. Para isso, foi elaborada uma curva de amplificação de amostras não infectadas pelo ZIKV. Observou-se que não houve a amplificação do RNA viral das amostras não infectadas pelo ZIKV, demonstrando assim que a sonda utilizada é específica como demonstrado na **Figura 12 B**.

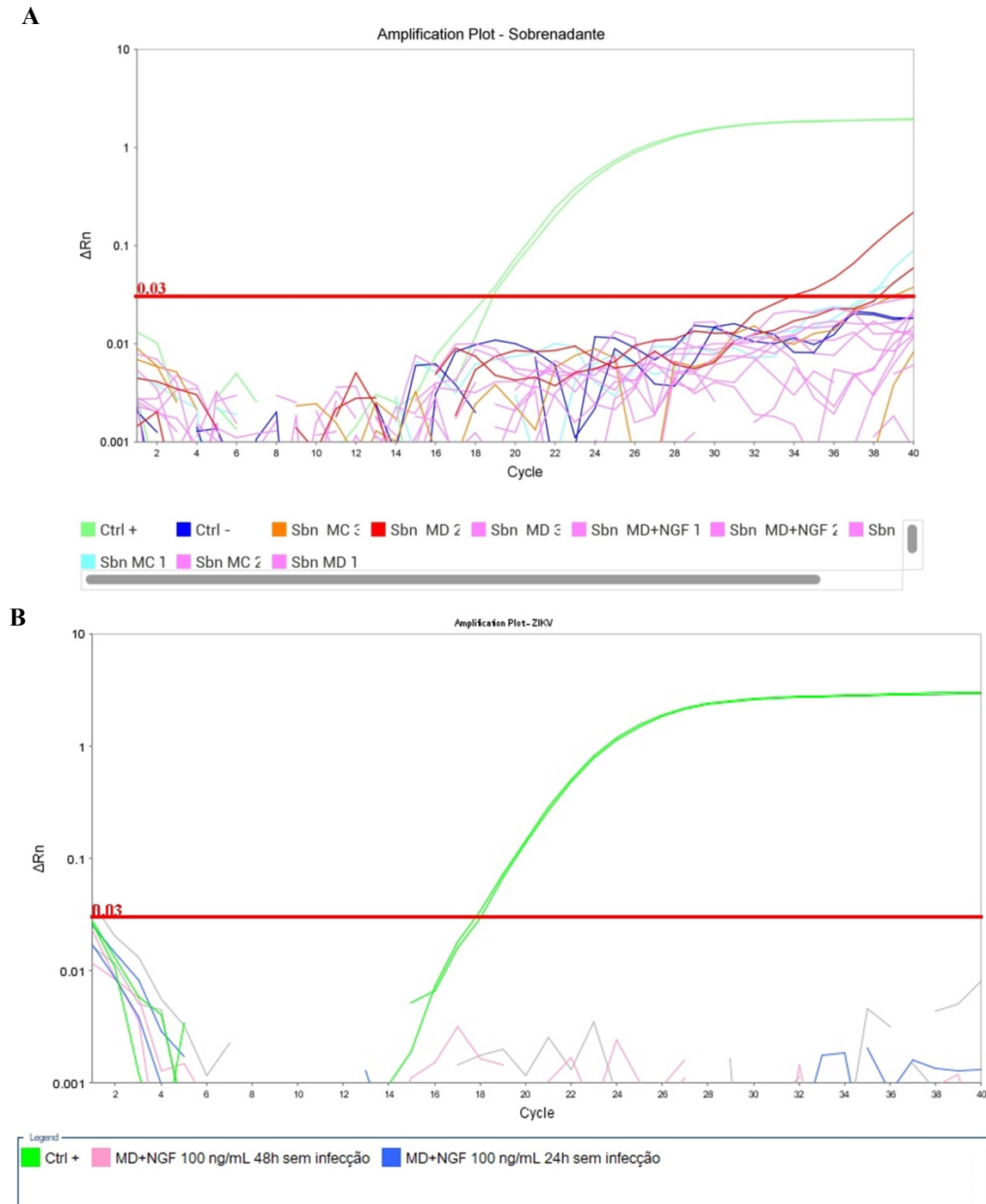


Figura 12. Curva de amplificação do RNA viral no sobrenadante de células PC-12 infectadas e não infectadas pelo ZIKV. Foram plaqueadas 2×10^5 células PC-12/poço e cultivadas pelo período de 24h com tratamentos contendo MD, MD com 200 ng/mL de NGF e MC. Para promover a infecção, as células foram expostas ao ZIKV em MOI 1 por 2 horas e cultivadas por mais 24h. O controle positivo (Ctrl+) é representado pelo cDNA de ZIKV com a concentração de $1,4 \times 10^6$. A expressão gênica de ZIKV foi determinada no sobrenadante das células através de RT-PCRq em tempo real. (A) Curva de amplificação gênica do vírus no sobrenadante das células PC-12 infectadas pelo ZIKV. (B) Curva de amplificação gênica do RNA viral em células não infectadas pelo ZIKV.

5.5 Perfil de expressão gênica de GAP-43 em células PC-12 infectadas ou não por ZIKV.

Com o intuito de avaliar se o ZIKV altera a expressão de mRNA de GAP-43 nos estímulos empregados, foi realizada a infecção das células PC-12 com o ZIKV MOI 1 por 2 horas e a expressão gênica das células foi avaliada após 24 horas da exposição em diferentes condições de cultura. Como pode ser observado na **Figura 13 A, B e C**, a infecção com o ZIKV aumentou a expressão de GAP-43 nas células PC-12 quando submetidas ao MD sem NGF (3,30 vezes), ao MD+NGF 200 ng/mL (2 vezes) e também ao MC (2 vezes).

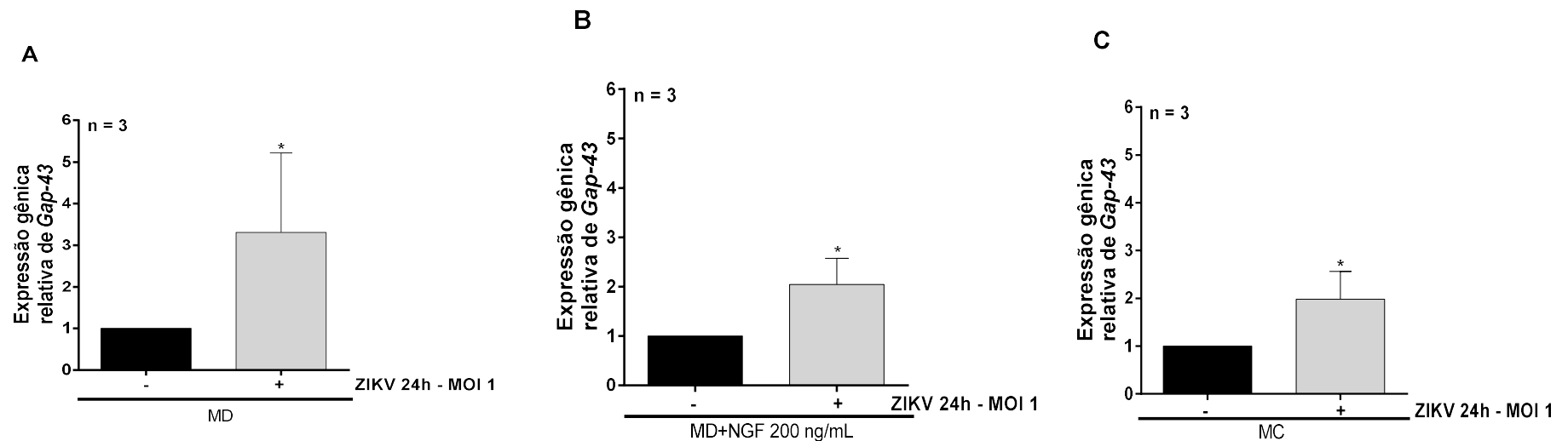


Figura 13. A infecção com o ZIKV induz aumento da expressão da GAP-43 em células PC-12. As células PC-12 foram tratadas por 24h com o ZIKV com os tratamentos MD sem NGF, NGF 200 ng/mL e MC. A expressão relativa de mRNA de GAP-43 foi determinada por RT-PCRq em tempo real e normalizada pelos valores de β -actina. (A) Comparação entre os tratamentos MD sem infecção vs MD com a infecção ZIKV; (B) Comparação entre os tratamentos MD + NGF 200 ng/mL sem infecção vs MD + NGF 200 ng/mL com a infecção ZIKV e (C) Comparação entre os tratamentos MC sem infecção vs MC com a infecção ZIKV. Os dados foram expressos como média \pm SEM, n=3 em cada grupo. Expressão gênica avaliada pelo teste de Mann-Whitney unilateral. *p<0,05 vs grupos sem infecção.

Além disso, é possível observar visualmente que ocorrem mudanças na morfologia das células PC-12 infectadas pelo ZIKV (**Figura 14 B, D e E**) em comparação com as células não infectadas pelo ZIKV (**Figura 14 A, C e F**). As células PC-12 não se aderiam bem aos poços no tratamento do ZIKV com exceção do MC (**Figura 14 B**), visto que apesar de terem sido empregadas a mesma quantidade de células no plaqueamento (2×10^5 células por poço), percebe-se uma menor densidade de células PC-12 infectadas pelo ZIKV. Ademais pode-se notar, visualmente, uma grande quantidade de células PC-12 com o núcleo maior e tamanho diferente quando tratadas com o ZIKV, **Figura 14 E**.

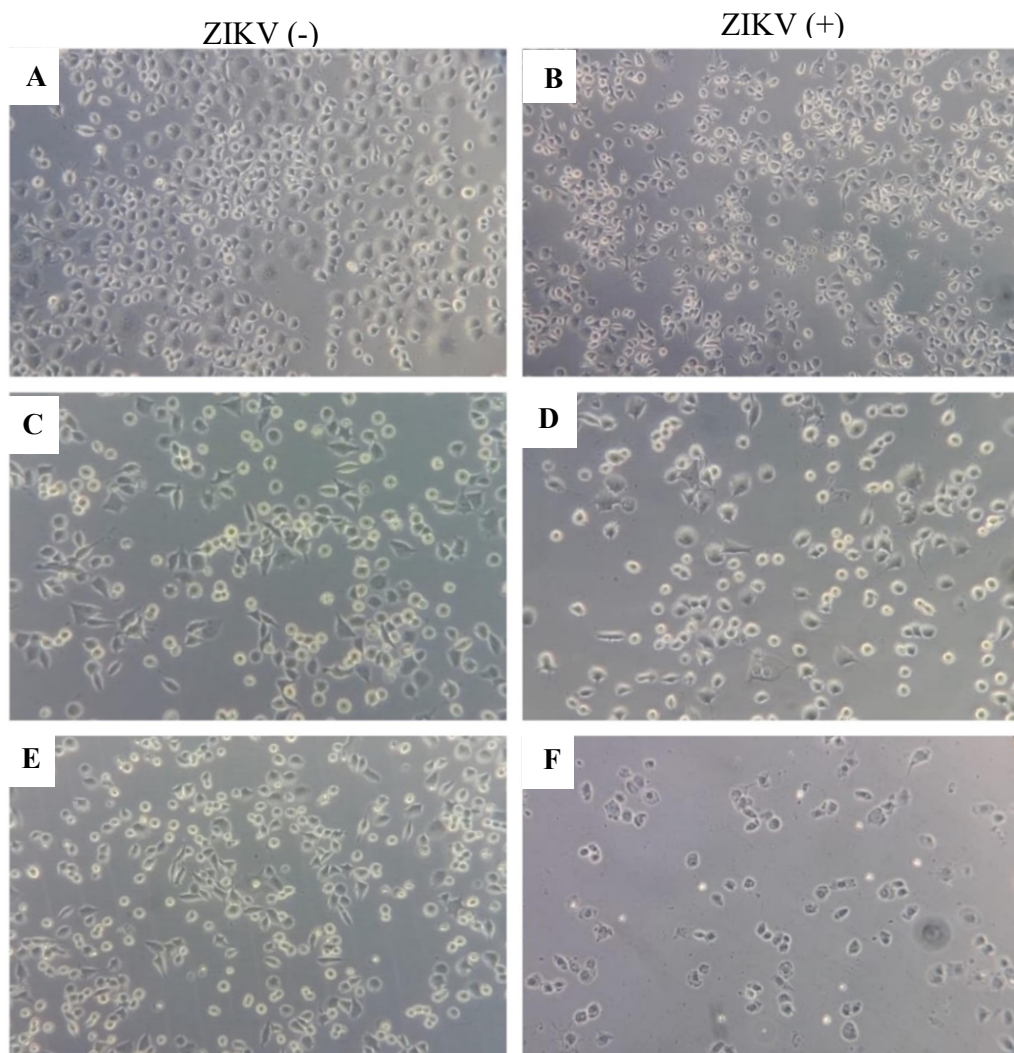


Figura 14. Fotomicrografia de cultura de células PC-12 em placas tratadas com colágeno IV, comparação de grupos sem infecção vs com infecção pelo ZIKV. Fotomicrografia obtida em microscópio invertido com contraste de fase (aumento 100X). As células PC-12 foram cultivadas com densidade celular de 2×10^5 células/poço e mantidas a 37°C e 5% de CO₂. (A) Células PC-12 sem infecção tratadas com MC pelo ZIKV 24h. (B) Células PC-12 infectadas pelo ZIKV tratadas com MC 24h. (C) Células PC-12 sem infecção pelo ZIKV tratadas com MD com NGF 200 ng/mL por 24h. (D) Células PC-12 infectadas pelo ZIKV tratadas com MD com NGF 200 ng/mL por 24h. (E) Células PC-12 sem infecção tratadas com MD sem NGF por 24h. (F) Células PC-12 infectadas pelo ZIKV tratadas com MD sem NGF por 24h. Imagens representativas de cada estímulo. Imagens realizadas pelo autor.

6. DISCUSSÃO

Uma preocupação atual da comunidade científica é a redução do uso de animais em experimentos. Dentre várias técnicas que podem ser aplicadas para alcançar tal meta é o uso de estudos *in vitro*. Nesse trabalho foram utilizadas células PC-12, pois essas se mostram uma maneira eficaz de complementar, substituir (inicialmente experimentos *in vitro* com cultura primária) e reduzir o uso de animais em experimentos, obedecendo ao princípio dos 3Rs (*Replacement, Refinement & Reduction*) preconizado pela *National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research* (NC3R's, 2019). Além disso, as células PC-12 quando diferenciadas com NGF são capazes de sintetizar catecolaminas (ex.: noradrenalina e dopamina) e de expressar genes neuronais específicos, como a GAP-43 (Liu, Wang, & Lu 2015). Ainda como característica, ao se diferenciarem em células neurônio-*like*, essas células sofrem mudanças morfológicas, como por exemplo a extensão de neuritos.

É importante ressaltar que no processo de diferenciação de células PC-12 em células neurônio-*like* o tratamento da superfície de crescimento celular com fatores de adesão melhora a resposta destas ao NGF. Ogra e colaboradores (2016) e Mazia, Schatten & Sale (1975) mostraram que o PLL facilita a fixação e melhora a diferenciação das células PC-12 em placas, ao passo que Orłowska e colaboradores (2017) relataram que a adesão das PC-12 diferenciadas também é eficiente com o pré-tratamento com colágeno IV.

Assim, neste trabalho avaliamos dois desses fatores, o colágeno IV e o PLL, ambos muito usados em trabalhos que envolvem células PC-12 diferenciadas. Nossos resultados demonstram que as células PC-12 que foram semeadas em placas tratadas com colágeno IV obtiveram uma melhor adesão do que as células semeadas em placas tratadas com PLL. Corroborando nosso resultado, Tomaselli, Damsky & Reichardt (1988) mostraram que colágeno de tipo IV em superfícies revestidas promoveu uma adesão de grau maior em células PC-12 quando comparado com fibronectina.

Uma vez estabelecido que o uso de fatores de adesão melhora o processo de cultura das células PC-12, a próxima pergunta a ser respondida foi a avaliação da expressão de GAP-43. Nossos resultados demonstram que células PC-12 mesmo quando não estimuladas com NGF, expressam o mRNA da GAP-43. Este dado foi importante, pois com essa avaliação preliminar foi possível dar continuidade aos demais ensaios.

Frey e colaboradores (2000) utilizam a expressão do mRNA de GAP-43 como um marcador de crescimento de neuritos em células PC-12 em diferenciação. Ainda, Yankner e colaboradores (1990) e Morton e Buss (1992) mostraram que houve aumento da expressão do mRNA de GAP-43 quando houve crescimento no número de neuritos em células PC-12. Irwin e colaboradores (2002) e Liu, Wang, & Lu (2015) averiguaram que após o tratamento com NGF em células PC-12, ocorrem mudanças morfológicas e funcionais que expressão genes neuronais específicos, tais como a proteína GAP-43. No entanto, observamos que a expressão de GAP-43 em células PC-12 diferenciadas e não diferenciadas não sofreu alterações apesar de terem sido usados diferentes concentrações de NGF.

A partir desses dados, levantou-se a hipótese de que esse fenômeno ocorre devido ao período em que as células ficaram expostas ao NGF nos nossos experimentos (24h e 48h). Por exemplo, Santos e colaboradores (2017) utilizaram o NGF 100 ng/mL por 72 horas para fazer a avaliação da diferenciação de células PC-12. Além disso, Schimmelpfeng, Weibezahn, & Dertinger, (2004) utilizaram NGF 50 ng/mL pelo período de 5 a 7 dias. Entretanto, em nosso laboratório foi padronizado que o crescimento celular seria avaliado até 48h após o estímulo com NGF, uma vez que após este período houve perda de adesão celular, o que impossibilitava o crescimento de neuritos (Freire, 2018).

Além dos fatores de adesão utilizados, também foi observada uma grande densidade de células nos poços em que o meio completo foi empregado. Provavelmente isso acontece devido aos 5% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de soro de cavalo (HS), que é maior na composição do MC em relação ao MD que não possui SFB e tem apenas 1% de HS, favorecendo dessa maneira a proliferação das células PC-12. Greene e Tischler (1976) afirmaram que o crescimento celular das PC-12 foi insatisfatório quando o meio completo não foi utilizado, sendo essa diferença evidenciada principalmente em placas tratadas com colágeno IV. Desta forma, decidimos prosseguir os experimentos utilizando somente o colágeno IV como fator de adesão para as células PC-12.

Uma vez estabelecido o fator de adesão e o perfil de expressão da GAP-43 em células PC-12 diferenciadas e não diferenciadas, foi avaliado se esta linhagem de células é suscetível à infecção pelo ZIKV, visto que essas células podem ajudar a responder perguntas importantes no campo da neurociência, como a aqui proposta, sobre a relação da infecção viral com processos moleculares que culminam com a toxicidade neuronal.

Nossos resultados mostram que o ZIKV é capaz de infectar as células PC-12 diferenciadas e não diferenciadas. Além disso, observou-se a presença de RNA viral de ZIKV no sobrenadante dessas amostras. Até o presente momento, não há artigos publicados a

respeito da infecção de células PC-12 por ZIKV. No entanto, existem trabalhos demonstrando que outros vírus da família Flaviridae, como o vírus da encefalite japonesa (JEV), infectam as células PC-12 (Li *et al.* 2017). Estes autores mostraram que o JEV tem tropismo pelas células PC-12 diferenciadas, e 5 dias de diferenciação causa uma maior expressão do mRNA do JEV do que 1 dia de diferenciação. Aventou-se a hipótese que a baixa expressão do RNA viral em células PC-12 diferenciadas possa estar correlacionada com o tempo utilizado no nosso trabalho. Curiosamente, o sobrenadante de duas amostras de MC e em uma amostra de MD expressaram o RNA do ZIKV, porém nas demais amostras não houve detecção. É possível que o tempo de 24h após a infecção pelo ZIKV não tenha sido suficiente para a expressão do mRNA viral.

Embora não tenha sido objeto de estudo deste trabalho, os tipos de receptores que as células expressam podem influenciar a susceptibilidade à infecção pelo ZIKV. Apesar de não ser totalmente elucidado como ocorre o processo de infecção pelo ZIKV, uma diversidade de artigos relata a presença de receptores que facilitam a infecção desse vírus, sendo esses os receptores Tyro-3, AXL e MER (TAM), receptores de tirosina-quinases (para revisão ver Oliveira e Peron, 2019). As células PC-12 expressam os receptores Tyro-3 e o NGF tem um papel importante na regulação desses receptores (para revisão ver Wang *et al.* 2011).

Estabelecido que as células PC-12 são passíveis de serem infectadas pelo ZIKV, foi avaliado se a infecção altera a expressão gênica de GAP-43 em diferentes condições experimentais. Para isso, nós usamos meio completo ou de diferenciação suplementado ou não com NGF. Nossos resultados demonstram que em todos os tratamentos houve uma maior expressão do mRNA da GAP-43 quando as células eram infectadas pelo ZIKV. Essa expressão aumentada em resposta à infecção do ZIKV pode ocorrer devido à neuroplasticidade como mecanismo de reparo de danos causados pelo ZIKV nas células PC-12. Entretanto, essa hipótese não pôde ser confirmada devido ao curto período de avaliação das células infectadas (24h). Embora a GAP-43 esteja com sua expressão gênica elevada, ainda é possível visualizar uma grande diferença morfológica das células infectadas quando comparadas as não infectadas.

No nosso trabalho utilizamos células PC-12 como possível modelo experimental para o estudo das alterações neuronais causadas pelo ZIKV. A partir dos nossos resultados, podemos concluir que apesar de haver algumas limitações, como ausência de bainha de mielina nessa linhagem celular, as células PC-12 podem ser utilizadas para avaliar outras alterações que o vírus causa no sistema nervoso.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho é possível afirmar que as células PC-12 podem ser utilizadas como ferramenta para análise de neurotoxicidade induzida pelo ZIKV. Portanto, estes resultados mostram que há correlação entre o aumento da expressão da proteína de GAP-43 e a infecção pelo ZIKV, porém, ainda são necessários mais estudos para elucidar qual a relação entre os dois eventos.

8. PERSPECTIVA

O presente estudo pode servir como base para outros trabalhos para compreender a relação entre ZIKV, GAP-43 e células PC-12, além de elaborar questionamentos para avaliar a correlação dessas variáveis, tais como:

- Qual é o mecanismo do ZIKV para aumentar a expressão de GAP-43?
- Quais são outros parâmetros que poderiam auxiliar na avaliação do dano neuronal?
- Após um período maior de exposição como seria a expressão relativa de ZIKV em células PC-12?
- Qual seria a expressão relativa de GAP-43 após a exposição de células PC-12 a NGF por um período maior que 48h?

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-jahdari, W. S., Saito, S., Nakano, T., & Goto, F. (2006). General Anesthesia Propofol induces growth cone collapse and neurite retractions in chick explant culture. *Journal Canadian journal of anesthesia*, 53(11), 1078–1085.

Araujo, L. M., Ferreira, M. L. B., & Nascimento, O. J. (2016). Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 74(3), 253–255.

Benowitz, Larry I. e Aryeh Routtenberg. 1997. “GAP-43: An intrinsic determinant of neuronal development and plasticity”. *Trends in Neurosciences*20(2):84–91.

Biffo, S., J. Verhaagen, L. H. Schrama, P. Schotman, W. Danho, e F. L. Margolis. 1990. “B-50/GAP43 Expression Correlates with Process Outgrowth in the Embryonic Mouse Nervous System”. *European Journal of Neuroscience*2(6):487–99.

Boczek, T., Ferenc, B., Lisek, M., & Zylinska, L. (2015). Regulation of GAP43/calmodulin complex formation via calcineurin-dependent mechanism in differentiated PC12 cells with altered PMCA isoforms composition. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 407(1–2), 251–262.

Brasil, P., Calvet, G. A., Siqueira, A. M., Wakimoto, M., de Sequeira, P. C., Nobre, A., Jaenisch, T. (2016). Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(4), 1–13.

Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., de Filippis, A. M. B. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(6), 653–660.

Cao-Lormeau, Van Mai. 2014. “RE: Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013”. *Emerging Infectious Diseases* 20(11):1960.

Casoli, T., Di Stefano, G., Gracciotti, N., Giovagnetti, S., Fattoretti, P., Solazzi, M., et al. (2001). Cellular distribution of GAP-43 mRNA in hippocampus and cerebellum of adult rat brain by in situ RT-PCR. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1195–1196.

Chang, C., Ortiz, K., Ansari, A., & Gershwin, M. E. (2016). The Zika outbreak of the 21st century. *Journal of Autoimmunity*, 68, 1–13.

Dick, G.; Kitchen, S.; Haddow, A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 46, n. 5, p. 509–20, 1952.

Donnelly, C J., Dianna, E W., Mei Xu, Chhavy T., Chunsu J., Soonmoon Y, N., Carolyn S., Catherine B., Kirn-Safran, Jan, V M., Arthur E., Sung O, Y., Gary J. B., Jeffery L. T., 2011. “Limited availability of ZBP1 restricts axonal mRNA localization and nerve regeneration capacity”. *EMBO Journal*30(22):4665–77.

Esposito, S., & Longo, M. R. (2017). Guillain–Barré syndrome. *Autoimmunity Reviews*, 16(1), 96–101.

European Centre for Disease Prevention and Control. Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Stockholm, Sweden: European Centre for Disease Prevention and Control; 2015. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/zika-virus-americas-association-with-microcephaly-rapid-risk-assessment.pdf>.

Ferreira, R. S., dos Santos, N. A. G., Martins, N. M., Fernandes, L. S., dos Santos, A. C. (2016). Non-cytotoxic Concentration of Cisplatin Decreases Neuroplasticity-Related Proteins and Neurite Outgrowth Without Affecting the Expression of NGF in PC12 Cells. *Neurochemical Research*, 41(11), 2993–3003.

Flynn, K. C. (2013). The cytoskeleton and neurite initiation. *Bioarchitecture*, 3(4), 86–109.

FREIRE, V. B. (2018). *Uso de células pc12 como ferramenta para estudos dos efeitos da infecção pelo zika vírus em neurônios*. Univerdade de Brasília , Brasília

Frey, D., Thorsten L., Lan X., Corinna S., Pico C., 2000. “Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity”. *Journal of Cell Biology* 149(7):1443–53.

Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7), 2424–2428.

Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Missé, D. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology*, 89(17), 8880–8896.

Holahan, M. R. (2017). A Shift from a Pivotal to Supporting Role for the Growth-Associated Protein (GAP-43) in the Coordination of Axonal Structural and Functional Plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(August), 1–19.

Irwin, N., S. Chao, L., Goritchenko, A., Horiuchi, P., Greengard, A. C., Nairn, Benowitz, I., 2002. “Nerve growth factor controls GAP-43 mRNA stability via the phosphoprotein ARPP-19”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(19):12427–31.

Jacovina, A. T., Zhong, F., Khazanova, E., Lev, E., Deora, A. B., & Hajjar, K. A. (2001). Neuritogenesis and the Nerve Growth Factor-induced Differentiation of PC-12 Cells Requires Annexin II-mediated Plasmin Generation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 49350–49358.

Jancso, J., Elisabeth K., Aurelia Jancso-Garbor. 1977. “© 1977 Nature Publishing Group”. *Nature* 270:673–78.

Kapfhammer, J. P., Schwab, M. E., (1994). Increased Expression of the Growth-associated Protein GAP-43 in the Myelin-free Rat Spinal Cord. *European Journal of Neuroscience*, 6(3), 403–411.

Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., Cropp, C. B. (1998). Phylogeny of the genus Flavivirus. *Journal of Virology*, 72(1), 73–83.

- Lanciotti, R S., Olga, L, K., Janeen J. L., Jason O. V., Amy J. L., Alison J. J., Stephanie M. S., Mark R. D., 2008. “Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007”. *Emerging Infectious Diseases* 14(8):1232–39.
- Levi-Montalcini, R. (1987). Nerve growth factor: 35 years later. *Science*, 98(10), 5446–5451.
- Levine, J., and Willard, M. (1980). The composition and organization of axonally transported proteins in the retinal ganglion cells of the guinea pig. *Brain Res.*194, 137–154.
- Li Z-Y., Zhang Y-P., Zhang J., Zhang S-B., Li D., Huang Z-Z., The possible involvement of JNK activation in the spinal dorsal horn in bortezomib-induced allodynia: the role of TNF- α and IL-1 β . *J Anesth [Internet]*. 2015;30(1):55–63.
- Li, J. R., Wu, C. C., Chang, C. Y., Ou, Y. C., Lin, S. Y., Wang, Y. Y., Chen, C. J. (2017). Susceptibility of Naïve and differentiated PC12 cells to Japanese encephalitis virus infection. *IUBMB Life*, 69(2), 79–87.
- Li, P. E. I., Wang, S., Zhang, R., Pei, J., Chen, L., Cao, Y., Yang, G. (2018). Identification of CSF biomarkers by proteomics in Guillain-Barré syndrome, 5177–5182.
- Liu, X., Wang, X., Lu, J. U. N. (2015). Tenuifoliside A promotes neurite outgrowth in PC12 cells via the PI3K / AKT and MEK / ERK / CREB signaling pathways, 7637–7642.
- Liu, Z., Jin, Y. Q., Chen, L., Wang, Y., Yang, X., Cheng, J., Shen, Z. (2015). Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PLoS ONE*, 10(4), 1–17.
- Livak KJ., Schmittgen T, D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*.2001;25:402–8.
- Luz, K. G., Santos, G. I. V., Vieira, R. de M., (2015). Febre pelo vírus Zika. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 24(4), 785–788.
- Mazia, D., Gerald S., Winfield S., 1975. “Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine: Applications to electron microscopy”. *Journal of Cell Biology* 66(1):198–200.
- Meiri, K. F., Pfenninger, K. H., Willard, M. B. (1986). Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and

corresponds to pp46, a major polypeptide of a subcellular fraction enriched in growth cones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(10), 3537–41.

Merianda, T. T., Ying J., Ashley L. K., Pabitra K. S., Itzhak F., Jeffery L. T., 2017. “Neural Progenitor Cells Promote Axonal Growth and Alter Axonal mRNA Localization in Adult Neurons”. *Eneuro* 4 (1): ENEURO.0171-16.2017.

Mishra, K., K., Sakshi G., Kakoli B., 2016. “SOCS3 induces neurite differentiation and promotes neuronal cell survival”. *IUBMB Life* 68(6):468–76.

Morton, A. J., Timothy N. B., 1992. “Accelerated Differentiation in Response to Retinoic Acid After Retrovirally Mediated Gene Transfer of GAP-43 into Mouse Neuroblastoma Cells”. *European Journal of Neuroscience* 4(10):910–16.

Musso, D., Nilles, E. J., Cao-Lormeau, V. M. (2014). Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), O595–O596.

(NC3Rs). Acesso em 30 de junho de 2019, disponível em National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research: <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>

Nedivi, E., Basi, G., S, Akey, I., V., Skene J., H., 2018. “A neural-specific GAP-43 core promoter located between unusual DNA elements that interact to regulate its activity”. *The Journal of Neuroscience* 12(3):691–704.

Ogra, Y., Aya T., Naohiro H., Moeko S., Siyuan W., Tsutomu I., Ayako Y., Yasumi A., e Noriyuki S., 2016. “Changes in intracellular copper concentration and copper-regulating gene expression after PC12 differentiation into neurons”. *Scientific Reports* 6(August):1–9.

Oh, Y., Zhang, F., Wang, Y., Lee, E. M., Choi, I. Y., Lim, H., Biology, C. (2018). HHS Public Access, 20(9), 1209–1212.

Oliveira, L., G., Jean P., S., P., 2019. “Viral receptors for flaviviruses: Not only gatekeepers”. *Journal of Leukocyte Biology* (January):1–7.

Orlowska, A., Pallale T., P., Mohammad A. A., I., K., Andre D., Huu K., Duy N., Shahram G., Vladimir B., Russell J. C., Elena P., I., 2017. “The effect of coatings and nerve growth factor on attachment and differentiation of Pheochromocytoma Cells”. *Materials* 11(1):1–10.

Ortoft, E., Pålman, S., Andersson, G., Parrow, V., Betsholtz, C., Hammerling, U. (1993). Human GAP-43 gene expression: multiple start sites for initiation of transcription in differentiating human neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 4, 549–561.

Parra, B., Lizarazo, J. Jiménez-Arango, J. A., Zea-Vera, A. F., González-Manrique, G., Vargas, J., Pardo, C. A. (2016). Guillain–Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia. *New England Journal of Medicine*, 375(16), 1513–1523.

Sanna, M. D., Ghelardini, C., Galeotti, N. (2016). Altered Expression of Cytoskeletal and Axonal Proteins in Oxaliplatin-Induced Neuropathy. *Pharmacology*, 97(3–4), 146–150.

Santos, N., A., G., Nádia M., M., Flávia M., S., Laís S., F., Ferreira R., S., Freitas O., Cardozo A., S., 2017. “The cannabinoid beta-caryophyllene (BCP) induces neuritogenesis in PC12 cells by a cannabinoid-receptor-independent mechanism”. *Chemico-Biological Interactions* 261:86–95.

Schaefer, A. W., Kabir, N., Forscher, P. (2002). Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *Journal of Cell Biology*, 158(1), 139–152.

Scheytt, S., Riediger, N., Braunsdorf, S., Sommer, C., & Üçeyler, N. (2015). Increased gene expression of growth associated protein-43 in skin of patients with early-stage peripheral neuropathies. *Journal of the Neurological Sciences*, 355(1–2), 131–137.

Schimmelpfeng, J., K. F. Weibezahn, H. Dertinger. 2004. “Quantification of NGF-dependent neuronal differentiation of PC-12 cells by means of neurofilament-L mRNA expression and neuronal outgrowth”. *Journal of Neuroscience Methods* 139(2):299–306.

Scott, J.N., Clark, A.W., Zochodne, D.W., 1999. Neurofilament and tubulin gene expression in progressive experimental diabetes: failure of synthesis and export by sensory neurons. *Brain* 122, 2109–2118.

Simpson, D.I.H., (1964). Zika virus infection in man, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 335–337.

Skene, J. H., Willard, M. (1981a). Changes in axonally transported proteins during axon regeneration in toad retinal ganglion cells. *J. Cell Biol.* 89, 86–95.

Skene, J. H., Willard, M. (1981b). Electrophoretic analysis of axonally transported proteins in toad retinal ganglion cells. *J. Neurochem.* 37, 79–87.

Tomaselli, K. J., C. H. Damsky, Reichardt L. F., 1988. “Purification and characterization of mammalian integrins expressed by a rat neuronal cell line (PC12): Evidence that they function as α/β heterodimeric receptors for laminin and type IV collagen”. *Journal of Cell Biology* 107(3):1241–52.

Unsicker, K., Katrin H., Günther S., Chaya K., 2005. “The chromaffin cell and its development”. *Neurochemical Research* 30(6–7):921–25.

Valtorta, F., Leoni, C. (1999). Molecular mechanisms of neurite extension. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 354(1381), 387–394.

Volpi, V. G., Pagani, I., Ghezzi, S., Iannaccone, M., D’antonio, M., & Vicenzi, E. (2018). Zika virus replication in dorsal root ganglia explants from interferon receptor1 knockout mice causes myelin degeneration. *Scientific Reports*, 8(1),

Wang, Q., Qing J., L., Bing X., Yan Z., Xiao M., W., 2011. “Expressions of Axl and Tyro-3 receptors are under regulation of nerve growth factor and are involved in differentiation of PC12 cells”. *Neuroscience Bulletin* 27(1):15–22.

Wasilewska-Sampaio, A. P. (2005). Neuritogenesis and neuronal differentiation promoted by 2,4-dinitrophenol, a novel anti-amyloidogenic compound. *The FASEB Journal*, 19(12), 1627–1636.

Willard, M., Cowan, W. M., and Vagelos, P. R. (1974). The polypeptide composition of intraxonally transported proteins: evidence for four transport velocities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 71, 2183–2187.

Xie, W., Judith A. S., Jun-Ming Z., 2017. “Active nerve regeneration with failed target reinnervation drives persistent neuropathic pain”. *Eneuro4* (February): ENEURO.0008-17.2017.

Xu, Q. G., Midha, R., Martinez, J. A., Guo, G. F., Zochodne, D. W. (2008). Facilitated sprouting in a peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 152(4), 877–887.

Yankner, B., A., Larry I. B., Lydia Villa-Komaroff, Rachael L. N., 1990. “Transfection of PC12 cells with the human GAP-43 gene: effects on neurite outgrowth and regeneration”. *Molecular Brain Research* 7(1):39–44.

Zanluca, C., Nunes C., D., S., 2016. “Zika virus – an overview”. *Microbes and Infection* 18(5):295–301.

Zwiers, H., Veldhuis, H. D., Schotman, P., Gispen, W. H. (1976) ACTH, cyclic nucleotides, and brain protein phosphorylation in vitro. *Neurochem. Res.* 1, 669-677.