

**ESCOLA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/CLÍNICA MÉDICA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS**

**FABIANA SPILLARI VIOLA**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO ZIKA VÍRUS EM LINHAGEM CELULAR DE**  
**GLIOBLASTOMA**

Porto Alegre, 2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



**Pontifícia Universidade Católica**  
**do Rio Grande do Sul**

---

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
ESCOLA DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/CLÍNICA MÉDICA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO ZIKA VÍRUS EM LINHAGEM CELULAR DE  
GLIOBLASTOMA**

FABIANA SPILLARI VIOLA

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina e Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa Da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Marinowic

Porto Alegre, 2019

---

---

## Ficha Catalográfica

V795a Viola, Fabiana Spillari

Avaliação da ação do Zika vírus em linhagem celular de glioblastoma / Fabiana Spillari Viola . – 2019.  
050.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa Da Costa.

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Marinowic.

1. glioblastoma. 2. zika vírus. 3. apoptose. 4. adesão. 5. migração. I. Costa, Jaderson Costa Da. II. Marinowic, Daniel. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

---

---

FABIANA SPILLARI VIOLA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO ZIKA VÍRUS EM LINHAGEM CELULAR DE  
GLIOBLASTOMA**

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina e Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa Da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Marinowic

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Andre Fay

---

Prof. Dr. Denise Cantarelli Machado

---

Prof. Dr. Cristiano Valim Bizzaro

Porto Alegre, 2019

---

---

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Jaderson, pela oportunidade e confiança,

Ao Daniel, pela incansável disponibilidade e empenho na condução deste trabalho,

A Dra Fernanda Morrone e Angelica Cappellari pelas excelentes contribuições,

A toda equipe do laboratório de Neurociências, meus sinceros agradecimentos.

---

---

## RESUMO

Introdução: O Glioblastoma é o tumor cerebral mais comum em adultos e, apesar dos tratamentos disponíveis, permanece um dos mais letais e de difícil tratamento, sendo que a maioria dos pacientes morre em dois anos. Novos tratamentos são necessários e, neste contexto, a terapia viral tem sido estudada. A infecção por Zika vírus (ZIKV), tem demonstrado, em estudos iniciais, que o vírus causa inibição de proliferação celular, bem como indução de apoptose e parece ter predileção por células neuronais em desenvolvimento.

Objetivo: Avaliar os efeitos da infecção por ZIKV em linhagem celular de glioblastoma.

Material e Métodos: Duas linhagens de glioblastoma (U138 e U 251), foram infectadas com ZIKV em três diferentes diluições (1:100, 1: 1000, 1: 10000). Foram realizados testes para avaliar a viabilidade celular por MTT, migração celular, adesão celular, apoptose (Caspase 3/7), níveis de interleucinas e marcadores celulares (CD14 e CD73). Todos os resultados foram comparados com controles.

Resultados: Nosso estudo demonstrou uma redução significativa ( $p < 0,005$ ) na capacidade de invasão celular nos três tempos analisados, com a diluição de 1:100 de ZIKV. Também ocorreu um aumento na adesão celular nas três diluições estudadas, bem como um aumento nas taxas de apoptose. Não houve alteração de migração celular e na viabilidade celular comparado com os controles. Também foi observado um aumento de expressão de CD14 e CD73.

Conclusões: Nossos resultados sugerem que ZIKV pode estar associada com aumento de expressão de CD73, aumentando a adesão e a infiltração celular, bem como aumentando as taxas de apoptose. Investigações adicionais são necessárias para explorar o potencial de uso de ZIKV no tratamento do glioblastoma.

---

---

## ABSTRACT

Introduction: Glioblastoma (GBM) is the most common central nervous system (CNS) tumor. Despite available therapies survival remains poor, and new treatment strategies are needed. Oncolytic viral therapy is under investigation in GBM. Zika virus (ZikV) infection has demonstrated inhibition of neuronal precursor cells proliferation in preclinical studies.

Objective: Evaluate the effects of ZikV infection on human glioblastoma cell lines.

Material and Methods: Two GBM cell lines (U138 and U251) were infected by 2 hours with ZIKV using the titer of PFU/ml diluted in 1:100, 1:1000, 1: 10000. Cell. We performed tests to evaluate cell viability by MTT and protease active assay, cell migration through a wound healing assay and cell infiltration using insert culture method. Also, the cell lines were tested by cell adhesion capacity, apoptosis (Caspase 3/7), interleukins levels and cell surface markers for CD 14 and CD73. These results were compared to controls.

Results: Our study has demonstrated a reduction in cell viability in U138 lineage through MTT assay. In the U251 lineage and in the others tests for cytotoxicity/viability, ZIKV did not alter cell viability neither cell migration compared to controls. We showed that ZIKV caused reduction in cell invasion and resulted in increased rates of apoptosis in both cell lines. We observed that infection of ZIKV caused increased rates of cell adhesion and CD73 marker.

Conclusions: These findings suggest that ZIKV infection may be associated with increased CD 73 Expression thus increasing cell adhesion and cell infiltration. The ZIKV may be cause an increase rates of apoptosis and influencing cell cytotoxicity and viability. Further investigations to explore the role of ZIKV in GBM treatment are warranted.

---

---

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação da análise da toxicidade celular por ensaio MTT após 2 horas de exposição das células a diferentes concentrações do ZIKV (1:10; 1:100 e 1:1000) 25
- Figura 2:** Análise de viabilidade celular, citotoxicidade e apoptose através do ensaio Triplex nos diferentes tempos e diluições do ZIKV..... 27
- Figura 3:** Ensaio de migração celular através da medida da distância entre as duas áreas contendo células..... 28
- Figura 4:** Análise do potencial de infiltração celular através de inserto. .... 29
- Figura 5:** Ensaio de adesão celular em Vero, U-138 e U-251 em células não infectadas (Controle) e células infectadas nas diferentes diluições do ZIKV..... 30
- Figura 6:** Imunoensaio para as interleucinas IL-4 e INF- $\gamma$  representados pela quantificação absoluta em picogramas por mL (pg/mL) através de comparação com curva padrão ..... 31
- Figura 7:** Representação gráfica da citometria de fluxo após a exposição das linhagens ao ZIKAV.. ..... 35
- Figura 8:** Representação do perfil de expressão dos marcadores CD14 e CD73 através da representação da média e desvio padrão do percentual de células positivas para cada marcador de superfície após a exposição as diferentes diluições do ZIKV..... 36
-



---

## LISTA DE ABREVIATURAS

**5 Fu:** 5 fluorocitocina

**CTLA-4:** Proteína T-linfócito-associada citotóxico 4

**FDA:** food and drug administration

**HSV-1:** herpes simples vírus

**IL-4:** Interleucina 4

**IL-6:** Interleucina 6

**INF $\gamma$ :** Interferon  $\gamma$

**PD -1:** Proteína de morte celular programada 1

**PVSRIPO:** Polio-rinovirus quimera

**TGF-  $\beta$ :** fator de crescimento transformador  $\beta$

**TNF:** fator de necrose tumoral

**ZIKV:** Zika vírus

---

---

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1 GLIOBLASTOMA .....	10
1.2 ZIKA VÍRUS .....	15
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 DELINEAMENTO .....	20
4.2 ASPECTOS ÉTICOS .....	20
4.3 LINHAGENS CELULARES .....	20
4.4 INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS .....	20
4.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE POR MTT .....	21
4.6 ENSAIO DE POTENCIAL DE INFILTRAÇÃO CELULAR .....	21
4.7 ENSAIO TRIPLEX .....	22
4.8 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR .....	22
4.9 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR .....	23
4.10 IMUNOENSAIO LUMINEX .....	23
4.11 CITOMETRIA DE FLUXO .....	24
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	24
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>45</b>
<b>9 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMISSÃO CIENTÍFICA .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO B - APROVAÇÃO SISGEN .....</b>	<b>50</b>

---

## 1 INTRODUÇÃO

A presente pesquisa busca avaliar possível ação do Zika vírus em linhagem celular humana de glioblastoma. A seguir contextualizo revisando a literatura científica pertinente referente ao glioblastoma e Zika vírus.

### 1.1 GLIOBLASTOMA

O glioblastoma é o tumor primário cerebral mais comum em adultos e, apesar do tratamento multidisciplinar composto por cirurgia, radio e quimioterapia, a sobrevida mediana é geralmente menos de um ano. Mesmo em condições mais favoráveis, a maioria dos pacientes morre em dois anos (1). O glioblastoma se caracteriza por ser o mais agressivo tumor cerebral em adultos e devido a capacidade de infiltração celular, rápida invasão e elevada recorrência, causada, principalmente, pela população celular de células tronco tumorais, bem como pela heterogeneidade celular e dificuldade de acesso as drogas pela barreira hematoencefálica, tornam esta doença de difícil tratamento (2). Com o conhecimento atual da complexidade desta neoplasia, as estratégias de tratamento necessitam uma abordagem multidisciplinar, envolvendo o conhecimento fisiopatológico dos mecanismos de invasão, migração e recorrência (3).

O Glioblastoma tem sido estudado há décadas como um tumor associado à imunossupressão, sendo que, observações iniciais, sugerem que pacientes com diagnóstico de glioblastoma possuem redução de resposta imune no sangue periférico. O efeito de uma neoplasia com predomínio de crescimento local pode ser explicado por produção de fatores imunossupressivos pelas células tumorais, entre eles, o *transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ ), citado como a chave das citocinas envolvidas com o efeito imunossupressivo observado em glioblastomas, além de outras (4). Também têm sido estudadas proteínas expressas na superfície celular dos glioblastomas que também atuam neste microambiente tumoral e que têm sido exploradas como alvos terapêuticos nas estratégias atuais que envolvem a imunoterapia (5).

Recentemente, a imunoterapia vem sendo utilizada no tratamento do câncer, através do uso de anticorpos dirigidos a determinadas proteínas (CTLA-4 e PD-1) que estão expressas em células T ou em certos tipos de células do sistema imune e que, usualmente tem expressão aumentada em muitos tumores sólidos.

---

Estes anticorpos, chamados de inibidores de pontos de verificação (*Checkpoint inhibitors*) tem demonstrado atividade anti-tumoral significativa em diferentes tipos de tumores, incluindo melanoma, pulmão, bexiga, tumores renais e de cabeça e pescoço e, atuam, bloqueando receptores imunossupressivos que inibem a célula T, facilitando a resposta imune tumoral (6).

Respostas importantes tem sido vistas com imunoterapia em diferentes tipos de tumores sólidos, como pulmão e melanoma e, neste cenário, alguns tumores parecem ser mais sensíveis a este tratamento o levando a um conceito de tumor “quente “ e tumor “frio”, sendo que o glioblastoma, seria um “tumor frio”, por não apresentar respostas significativas a imunoterapia, o que parece ter múltiplas causas, entre as quais, defeitos na apresentação de antígenos, imunossupressão acentuada e fatores físicos como hipóxia e necrose (5).

No glioblastoma, estes fatores podem ser locais ou sistêmicos, entre os sistêmicos, podemos citar a resposta reduzida das células T, níveis de imunoglobulinas, função dos monócitos e aumento de fatores como CD4, CD 25, FoxP3 e células T reguladoras. Além disso, o uso de corticosteróides, que causa imunossupressão e o uso de quimioterapia que causa linfopenia prolongada, também são fatores associados a imunossupressão. Entre os fatores locais, estão os relacionados aos fatores existentes no microambiente tumoral, que incluem, produção de citocinas imuno-inibitórias, como o fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular, prostaglandina-2, interleucina-10, infiltração de células T imunossupressivas regulatórias (Tregs) e redução da função da célula T, secundário a fatores físicos hostis, como hipóxia (7).

Em glioblastoma, a expressão de PD-1 pode ser encontrada em cerca de 2 a 88% dos casos, porém os estudos com anticorpos dirigidos ao PD-1 não parecem promissores em glioblastoma, pelo menos não quando utilizados isoladamente. Estudo recente, utilizando Nivolumabe (Anticorpo dirigido ao PD-1) em glioblastoma recorrente, não demonstrou diferença de sobrevida global comparado a Bevacizumabe.

---

Diversas estratégias estão sendo utilizadas para otimizar o tratamento dos glioblastomas, entre elas, o entendimento do perfil imunofenotípico destes tumores. Prosniak e colaboradores propuseram um perfil diferenciado em glioblastomas multiformes apresentando uma assinatura de células positivas para IL-10 em todo parênquima tumoral expressando também marcadores como CD136 e CD204. Além disso, apenas células positivas para CD14, CD11b, CD68 e CD163 isoladas de tecidos de glioblastoma multiforme com base na expressão de CD14, apresentaram positividade para IL-10 in vitro. Outro exemplo é a proteína CD73, responsável pela produção de adenosina durante a progressão do glioblastoma. A regulação negativa de CD73 ou sua inibição enzimática aumenta a ação de fármacos por mecanismo de sensibilização, diminuindo a progressão de glioblastoma em modelos de ratos (8).

Além destas estratégias, a terapia viral tem sido estudada há mais de 20 anos, como uma opção no tratamento do câncer, representando uma opção a ser explorada em gliomas. Inicialmente, a terapia viral foi uma estratégia utilizada separadamente da imunoterapia e baseada na replicação viral e subsequente destruição da célula tumoral. Contudo, hoje se sabe que o vírus pode ativar o sistema imune e ativar macrófagos através de receptores, além de infiltrar os linfócitos peritumorais, promovendo um microambiente inflamatório, o que torna esta terapia interessante em glioblastoma, que tem como característica a imunossupressão (9).

Entre as terapias virais estudadas, o uso de vírus oncolíticos, compreendem um grupo diverso de agentes biológicos com potencial uso no tratamento do câncer. Há muitos anos este tratamento tem sido estudado e, recentemente, um deles- *Talimogene Laherparepvec* foi aprovado pelo FDA para o tratamento do melanoma. O foco principal, nos estudos mais recentes é a identificação de agentes virais que possam ser modificados para se tornarem mais seletivos para o tumor, reduzindo os danos da exposição viral no paciente. Mais recentemente, o uso de vírus oncolíticos tem sido considerado como um tratamento de imunoterapia, no qual, para que ocorra maior eficácia, aconteça a ativação do sistema imune do hospedeiro para

---

resposta antitumoral, reduzindo a imunossupressão que caracteristicamente, ocorre no microambiente tumoral. O mecanismo geral para o entendimento da ação dos vírus oncolíticos reside no fato de que sua eficácia terapêutica ocorre através da combinação de morte celular e imunidade antitumoral. Uma variedade de vírus com diversas propriedades, estão em investigação clínica atualmente, como herpesvirus, adenovírus, vírus da varíola, sarampo, poliovírus, entre outros. Entre os estudados em gliomas os principais, são herpesvirus e, mais recentemente, poliovírus (10).

Estudos recentes em gliomas de alto grau com esta abordagem, incluem estudo fase II no qual um adenovírus que expressa o gene TK herpesvirus é injetado na cavidade cirúrgica de gliomas malignos recém diagnosticados após a ressecção cirúrgica e o paciente faz uso de uma droga anti-herpética oral (valacyclovir), enquanto realiza o tratamento padrão de radio e quimioterapia. Este estudo mostrou, em 48 pacientes que completaram o tratamento, uma mediana de sobrevida global de 17 meses para os pacientes que receberam a terapia viral, versus 13,5 meses para os pacientes que receberam o tratamento combinado de cirurgia, radio e quimioterapia (11).

O estudo pré-clínico com Toca 511, isolado ou associado a 5 fluorocitocina (5-FU) utiliza um vetor de replicação viral não oncolítico (Toca 511) que seletivamente infecta e se replica no microambiente tumoral, produzindo uma proteína, Citosina Deaminase, que converte 5-fluorocitosina em uma droga antineoplásica, 5-fluorouracil, resultando em morte celular. Modelos animais suportam um duplo mecanismo de ação do Toca 511, incluindo morte celular e indução de resposta sistêmica terapêutica (12).

O estudo fase I (NCT01470794) com Toca 511, em glioblastoma recorrente, avaliou a combinação de ressecção cirúrgica seguido de injeções locais (cavidade cirúrgica) de doses crescentes de Toca 511. Após seis semanas da injeção de Toca 511 e consequente replicação

---

viral, os pacientes foram submetidos a avaliação com ressonância nuclear magnética de crânio e exame neurológico. Foram 45 pacientes avaliados para resposta e, destes, houve 4,7% de resposta completa em dois pacientes com astrocitoma anaplásico, 4,7% em dois pacientes com glioblastoma, taxa de resposta objetiva de 9,3%, doença estável de 23,3%, benefício clínico de 36,7% e a mediana de sobrevida global de 13,6 meses. Os eventos adversos observados foram astenia e um caso de hidrocefalia (13).

Outro estudo pré-clínico recente, utilizando HSV-1 modificado em modelos animais de glioblastoma, demonstrou que o vírus modificado é capaz de se replicar e causar citotoxicidade nas células tumorais e não nas células cerebrais normais (14).

Recentemente, estudo clínico fase I, avaliou o potencial terapêutico de pólio vírus tipo I atenuado, utilizado através de injeção intra-tumoral, em pacientes com glioblastoma recidivado. A infecção por poliovírus nas células neoplásicas *in vitro*, resulta em efeitos citotóxicos e na ativação da resposta anti-viral inata. O efeito citotóxico e ativação do sistema imune em resposta ao poliovírus, pode levar a uma imunossupressão tumoral e provocar, também, imunidade anti-tumoral. Desta forma, o objetivo do estudo foi determinar o perfil de toxicidade e a dose recomendada para a fase II. Foram tratados 61 pacientes com glioblastoma recidivado e os resultados foram comparados com controles históricos tratados na instituição. Os pacientes foram submetidos a colocação de um cateter intra-tumoral através do qual receberam infusões de PVSRIPO em diferentes níveis de dose. Como eventos adversos, ocorreu somente um caso de hemorragia intracraniana, após a remoção do cateter não foram observados efeitos auto-imune sistêmicos, bem como não foram observados casos de encefalomielite, poliomiosite, ou meningite. Com uma mediana de seguimento de 27,6 meses, a mediana de sobrevida global entre os 61 pacientes que receberam PVSRIPO foi 12,5 meses, que foi maior que o controle histórico (11,3 meses) e a sobrevida global em 24 meses foi 21% para os pacientes que receberam PVSRIPO e 14% para os controles (15).

---

## 1.2 ZIKA VÍRUS

O Zika (ZIKV) vírus é um vírus de RNA encapsulado, da família *flaviviridae* que foi, primeiramente isolado em 1947 de um macaco na floresta Zika, na Uganda, sendo transmitido por várias espécies de mosquitos *Aedes*. Em 2015, houve um aumento dramático de infecções por ZIKV nas américas e a infecção clássica por ZIKV é semelhante a dengue e chikungunya e se manifesta por febre, cefaleia, artralgia, mialgia e rash maculopapular. Casos de manifestações neurológicas e síndrome de Guillain-Barre tem sido descritos nas epidemias (16). Relatos recentes do Ministério da Saúde no Brasil sugerem que o recente aumento dos casos de microcefalia no nordeste, possam ter associação com a infecção por ZIKV, bem com outras malformações fetais estudadas (17).

O ZIKV tem sido descrito na placenta, sangue e líquido amniótico de neonatos e fetos com microcefalia, o que pode indicar uma possível associação entre a infecção por ZIKA e estas malformações (18). A microcefalia é associada com redução de produção neuronal como uma consequência de defeitos proliferativos e morte de células progenitoras corticais (19).

Atualmente existem evidências de que o ZIKV é capaz de infectar e causar a morte de células-tronco neurais. Estudos em culturas celulares de células tronco pluripotentes, células-tronco neurais, neuroesferas e organóides cerebrais têm sido feitos para avaliar as consequências da infecção por ZIKV durante o processo de neurogênese e, os resultados destes estudos, tem demonstrado que o DNA viral é encontrado cerca de 24 horas após a exposição ao vírus nestas células e que as anormalidades mais frequentemente encontradas são anormalidades morfológicas e indução de apoptose (20).

Estudos recentes utilizando células-tronco pluripotentes induzidas, demonstram como o

---



vírus diretamente infecta estas células neurais humanas e as consequências desta infecção. Os autores também estudaram outras linhagens celulares humanas para avaliar sua suscetibilidade a infecção por ZIKV, porém as células humanas progenitoras neurais foram identificadas como alvo celular direto do vírus e as consequências desta infecção foi de redução no número de células viáveis, aumento de morte celular e desregulação do ciclo celular (21).

Em outro estudo recente, os autores utilizaram primeiramente células tronco tumorais, que foram infectadas com ZIKV com cepas africanas e brasileiras do vírus e, se verificou que mais de 60% das células tronco tumorais foram infectadas pelo vírus após 48 horas da exposição viral. Para a confirmação deste achado, os autores também utilizaram espécies de glioblastoma removidos após cirurgia, também expostos ao ZIKV em cerca de uma semana e houve infecção dos tumores, preferencialmente das células tronco tumorais, identificadas pela expressão de marcador. Em contrapartida, as células neuronais normais, não foram infectadas pelo vírus. Utilizando modelos animais de glioblastoma, também foi observado que houve redução do crescimento tumoral, demonstrando que este agente viral, eventualmente modificado, pode ser estudado como terapia viral em glioblastoma (22).

Estudo pré-clínico com cultura celular de micróglia isolada de camundongos e submetida a exposição por ZIKV (cepa SZ 01) demonstrou que o vírus infecta a micróglia e induz resposta inflamatória, identificada pela presença de mediadores de inflamação, com o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1). Além disso, a infecção viral promove uma redução de tamanho das neuroesferas, causando redução de seu crescimento, bem como inibição de proliferação das células precursoras neuronais. Estes dados em conjunto demonstram que a micróglia é altamente suscetível a infecção pelo ZIKV causando neuro-inflamação e produzindo fatores neurotóxicos que são prejudiciais para a proliferação e diferenciação de precursores neuronais (23).

---

Em outro estudo recente, com linhagem celular de tumor cerebral de origem embrionária e modelos animais de tumores cerebrais, a infecção pelo ZIKV, foi capaz de induzir morte celular e regressão tumoral (24).

---

## **2 JUSTIFICATIVA**

O glioblastoma é o tumor cerebral mais comum em adultos e o mais letal e de difícil tratamento, necessitando assim uma constante busca de novas alternativas terapêuticas, como melhora da ressecção cirúrgica, melhora das técnicas de radioterapia, bem como quimioterapia e terapia alvo que, não tem demonstrado melhora de sobrevida até o momento.

Dentre as alternativas em questão, a terapia viral vem sendo utilizada como uma nova estratégia de tratamento a ser explorada e, neste contexto, devido aos efeitos celulares observados em casos de microcefalia provocados pelo ZIKV e os dados recentes que sugerem que este agente viral possa ter predileção por células neuronais imaturas, seu uso visando contribuir para o tratamento do glioblastoma deve ser considerado.

---

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da infecção pelo ZIKA vírus em linhagem celular humana de glioblastoma.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar a influência do contato do ZIKV na citotoxicidade, viabilidade e apoptose através de ensaio de atividade mitocondrial e proteases em linhagens tumorais de glioblastoma;
  - Avaliar a capacidade de migração dos glioblastomas em modelo de cicatrização e infiltração através de insertos após exposição ao ZIKV;
  - Analisar a influência da exposição do ZIKV no potencial de adesão celular dos glioblastomas;
  - Quantificar as interleucinas INF- $\gamma$  e IL-4 por imunoenensaio no sobrenadante dos cultivos de glioblastoma expostos ao ZIKV;
  - Analisar a influência da exposição ao ZIKV nas linhagens de glioblastoma quanto a expressão dos marcadores de superfície CD14 e CD73 utilizando citometria de fluxo.
-

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO

A presente pesquisa é um estudo pré-clínico experimental, *in vitro*

### 4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Cérebro da PUCRS sob número 8249 e pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número de acesso A708680.

### 4.3 LINHAGENS CELULARES

Linhagens de glioblastoma (U-138, U-251) e controle VERO (ATCC - Rockville, MD, USA) pré-existent no laboratório de Neurociências do Instituto do Cérebro (InsCer) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina, 100 µg/mL de gentamicina sob condições de 5% CO<sub>2</sub> e 37°C. Para exposição ao ZIKV, as linhagens foram cultivadas em placas de cultura específicas para cada tipo de metodologia de análise.

### 4.4 INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS

As cepas do ZIKV foram cedidas pelo laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O vírus foi isolado no ano de 2016 de um paciente de 33 anos na cidade de São Paulo com características clínicas sugestivas a infecção por ZIKV e propagada em linhagem VERO (ATCC CRL-1586) e após isolada denominada como 17 SM ZIKV. A concentração do ZIKV foi determinada com base na confluência específica para cada metodologia de

---

análise obedecendo a titulação de PFU/ml diluídos em 1:10, 1:100 e 1:1000. Os ensaios foram realizados após 2 horas de exposição do ZIKV às linhagens celulares.

#### 4.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE POR MTT

Foram preparadas placas de 96 poços com 200 $\mu$ L de meio DMEM suplementado contendo  $4,5 \cdot 10^5$  células para cada poço. As células foram cultivadas por 24 horas e após esse período foram infectadas com ZIKV nas diferentes diluições. Após esse período, as células foram lavadas com DPBS e então adicionado 200 $\mu$ L de solução MTT na concentração de 5mg/mL em meio DMEM suplementado. As células foram incubadas por 4 horas a 37 °C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. O MTT foi solubilizado em 200 $\mu$ L de dimetil sulfoxido (DMSO) para realização da leitura. As Densidades Óticas foram medidas em um comprimento de onda de 570 nm em leitor de ELISA. Os valores de absorbância atribuídos as células não infectadas serviram de balizadores para o cálculo de percentual de viabilidade celular.

#### 4.6 ENSAIO DE POTENCIAL DE INFILTRAÇÃO CELULAR

Para avaliação da infiltração celular, as células foram cultivadas em insertos celulares FluoroBlock 8.0 (BD Biosciences). Esses insertos possuem uma membrana com poros de 8  $\mu$ m de diâmetro que permite a passagem das células para o sítio atrativo e um bloqueio de fluorescência para realização de leitura após coloração. As linhagens celulares foram expostas previamente ao ZIKV por 2 h, 12 h e 24 h na diluição 1:100. Após a exposição, as células foram tripsinizadas e cultivadas na câmara superior do inserto em 200  $\mu$ L de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foi adicionado na câmara inferior (placa de cultura), 600  $\mu$ L de meio de cultura DMEM (Gibco) suplementado com 30% de soro fetal bovino. As células permaneceram em cultivo por um período de 24 horas. Os insertos foram retirados dos poços, lavados duas vezes com tampão DPBS, fixados com paraformaldeído 4% e corados rodamina. Os insertos foram observados em microscópio confocal Zeiss LSM-5 exciter utilizando comprimento de onda de 543 nm. Para cada tempo de avaliação, foram

---

capturados aleatoriamente 20 campos visuais utilizando lentes objetivas de 20 X. As imagens foram quantificadas utilizando o parâmetro área de marcação através do software Image ProPlus 7.

#### 4.7 ENSAIO TRIPLEX

Após exposição prévia ao ZIKV das linhagens de glioblastoma e da linhagem controle Vero por 2 h, 12 h e 24 h nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000, as células foram tripsinizadas e cultivadas em uma placa de 96 poços na densidade celular de  $2 \times 10^4$  células por poço em sistema de triplicata. Foi adicionado 20  $\mu$ L de solução para quantificação da viabilidade/citotoxicidade com os substratos GF-AFC e bis-AAF-R110 e as células foram colocadas sob agitação orbital a 300 rpm por 30 segundos e então incubadas a 37°C por 30 minutos. Para mensuração da viabilidade e citotoxicidade celular, foi realizada a primeira leitura utilizando o parâmetro fluorescência nos comprimentos de onda de 400 nm excitação/505 nm emissão para viabilidade e 485 nm excitação/520 nm emissão para citotoxicidade. Após a leitura, foi adicionado o reagente Caspase-Glo® 3/7 e a placa foi novamente incubada a 37°C por 30 minutos. A leitura para mensuração da atividade da caspase3/7 foi realizada no modo luminescência. Todas as leituras foram realizadas utilizando leitor de placa SpectraMax M.

#### 4.8 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

As linhagens U-251, U-138 e Vero expostas ao ZIKV por 2 horas foram cultivadas em placas de 24 poços previamente marcadas com duas retas paralelas na parte inferior externa na placa com 2 mm de distância entre as retas. A densidade celular cultivada foi de  $2 \times 10^4$  por poço e as células foram mantidas sob condições de 5% CO<sub>2</sub> e 37°C em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos por 24 horas. O meio foi então substituído por DMEM suplementado com 5% de SFB a pós 24 horas o soro então foi reduzido a 0,5%. O meio de cultura foi substituído por DPBS e com o auxílio de uma micropipeta de 200  $\mu$ L foi feita uma fenda perpendicularmente a marcação do inferior da placa. O DPBS foi aspirado e as células foram novamente cultivadas em meio DMEM suplementado com

---

0,5% de SFB. Foi realizada a primeira captura (tempo 0) no ponto de intersecção entre as retas paralelas e a fenda gerada com o auxílio da micropipeta seguidas de duas outras capturas após 12 horas e 24 horas. As imagens foram analisadas utilizando software ImageProPlus7, sendo mensurado 10 pontos de distância entre as extremidades contendo as células em cada um dos tempos analisados. A capacidade migratória das células foi atribuída através da média das distâncias na fenda entre as extremidades contendo as células.

#### 4.9 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

Após exposição ao ZIKV por duas horas nas 3 diferentes diluições, as linhagens celulares e Vero foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 96 poços em triplicata com densidade celular de  $10^4$  células por poço em 100  $\mu$ L de DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos. Após duas horas de cultivo, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com DBPS e fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% por 10 minutos. As células foram novamente lavadas com DPBS e foi adicionado 50  $\mu$ L por poço de cristal violeta 0,5% dissolvido em metanol 20%. Após 10 minutos, o corante foi aspirado e foi adicionado 50  $\mu$ L de ácido acético por poço. Foi realizada mensuração utilizando leitor de placas em um comprimento de onda de 570 nm.

#### 4.10 IMUNOENSAIO LUMINEX

Foi realizado imunoenensaio Luminex para dosar os níveis de INF- $\gamma$  e IL-4 no sobrenadante do cultivo das linhagens após exposição ao ZIKV por 2 horas nas diferentes diluições. Foram adicionadas beads magnéticas correspondentes a cada interleucina na placa de 96 poços. Foi então adicionado 50  $\mu$ L de cada amostra e de cada ponto de diluição da curva padrão. A placa foi então colocada sob agitação em shaker a 500 rpm por 2 horas. A placa foi lavada utilizando tampão de lavagem e foi adicionado o anticorpo de detecção. A placa foi colocada sob agitação em shaker a 500 rpm por 30 minutos e então foi adicionado 50  $\mu$ L de streptavidina. A placa foi lavada utilizando tampão de lavagem e foi realizada

---



leitura em equipamento Luminex MAGPIx.

#### 4.11 CITOMETRIA DE FLUXO

Após exposição ao ZIKV, as células foram incubadas por 2 horas com os anticorpos anti-CD14 (Thermo Scientific) conjugado com PE e anti-CD73 (Thermo Scientific) conjugado com FITC. Após a incubação, as células foram lavadas com DBPS e a estimativa populacional de células marcada para cada anticorpo foi realizada através de citometria de fluxo utilizando equipamento BD FACSCalibur (BD Bioscience).

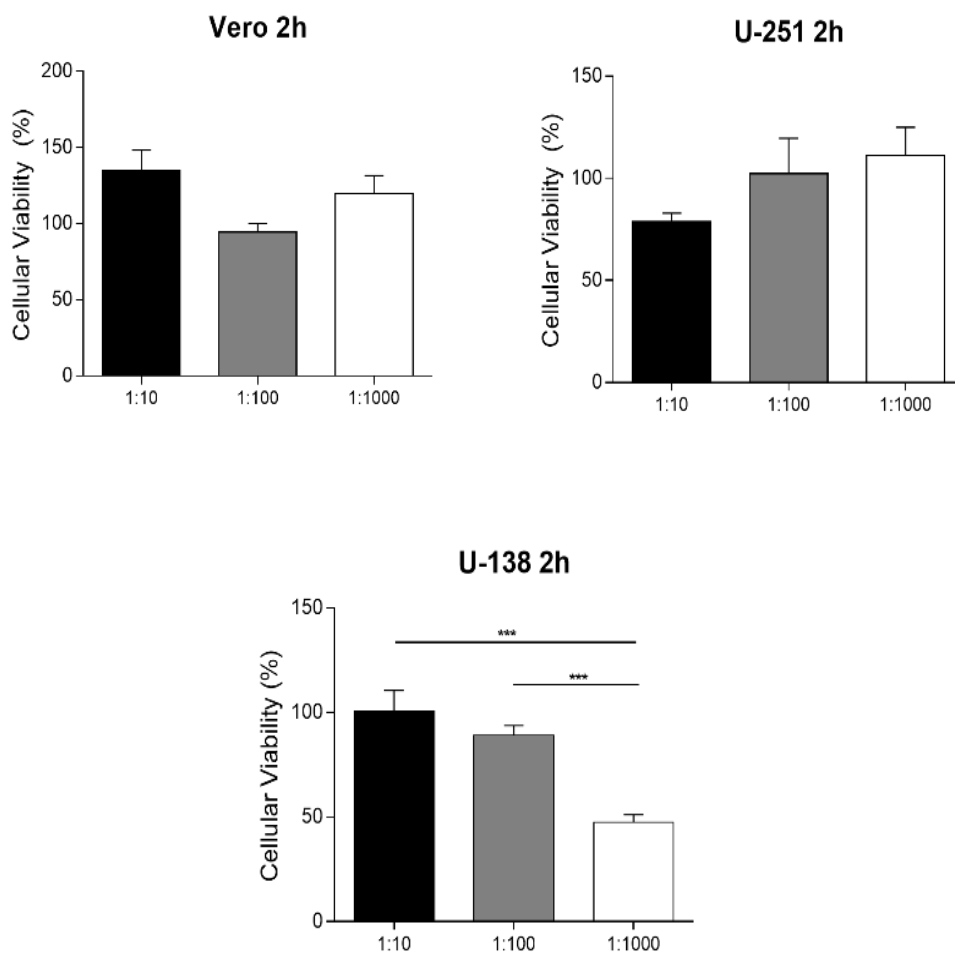
#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios MTT, Migração Celular, Adesão Celular e Citometria de Fluxo foram repetidos em dois momentos distintos compondo um  $n=2$ . Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p<0,05$ . Para os ensaios de Migração, Triplex e MTT, foi realizada análise de variância através do teste ANOVA de duas vias com pós teste de Bonferroni. Para os ensaios de Adesão, Invasão e Luminex, foi realizada análise de variância através do teste ANOVA de uma via com pós teste de Tukey.

---

## 5 RESULTADOS

Através do ensaio MTT não foram evidenciadas alterações significativas na viabilidade celular após a exposição das linhagens Vero e U-251 por 2 horas nas diferentes diluições do ZikaV (1:10, 1:100 e 1:1000). Houve uma redução na viabilidade celular da linhagem U-138 na diluição 1:100 e 1:1000, apresentando diferença estatisticamente significativa (Figura 1).



**Figura 1:** Representação da análise da toxicidade celular por ensaio MTT após 2 horas de exposição das células a diferentes concentrações do ZIKV (1:10; 1:100 e 1:1000). Os Valores são representados pela média e desvio padrão da percentagem de células viáveis em comparação a células não expostas ao vírus.

O ensaio Triplex não evidenciou alteração na viabilidade celular em nenhum dos tempos analisados (2 horas, 12 horas e 24 horas), em nenhuma das diluições (1:10, 1:100 e 1:1000) nas

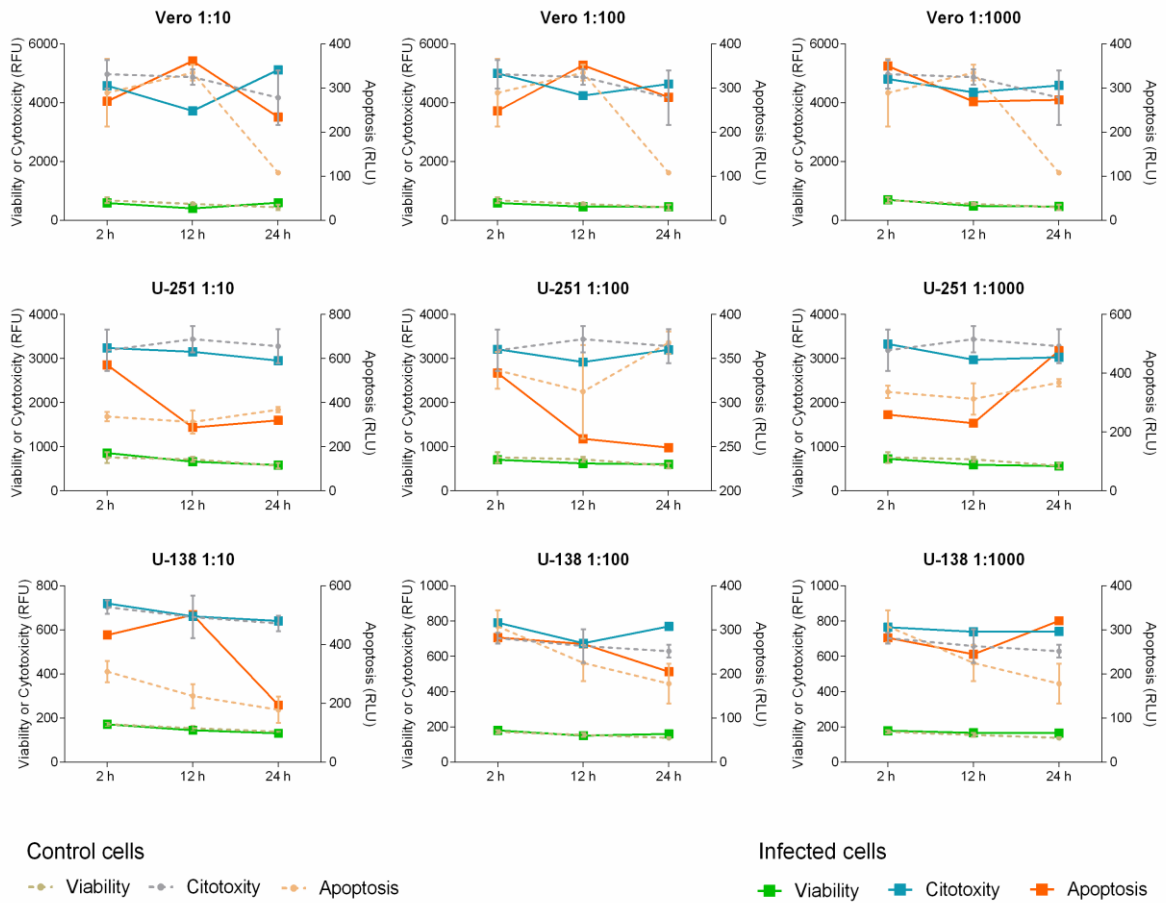
## *Resultados*

---

linhagens de glioblastoma (U-251 e U-138) e na linhagem controle Vero. Houve um aumento na taxa de apoptose nas linhagens U-251 e U-138 quando expostas por 2 horas a diluição 1:10 do ZIKV em comparação as células não infectadas. Nesta mesma diluição, após 12 e 24 horas de exposição, a taxa de apoptose da linhagem U-251 foi semelhante as células não infectadas pelo ZIKV. A linhagem U-138 aumentou a taxa de apoptose em 12 horas de exposição quando comparada a células não infectadas, porém após 24 horas de exposição os valores atribuídos a apoptose da linhagem U-138 foram semelhantes entre células infectadas e não infectadas. Na diluição 1:100 do ZIKV, a linhagem Vero apresentou um aumento nos valores referentes a células em apoptose quando comparado a células não infectadas após 24 horas de exposição. Os tempos 2 horas e 12 horas apresentaram valores semelhantes nas taxas de apoptose desta linhagem. Nesta mesma diluição, a linhagem U-251 apresentou um aumento na taxa de apoptose nos tempos 12 horas e 24 horas. Já a linhagem U-138 mostrou-se sem aparentes alterações nos valores atribuídos a taxa de apoptose em todos os tempos analisados. Na diluição 1:1000, a linhagem Vero aumentou sua taxa de apoptose após 24 horas de exposição sendo um comportamento muito semelhante ao ocorrido com a linhagem U-138 (Figura 2).

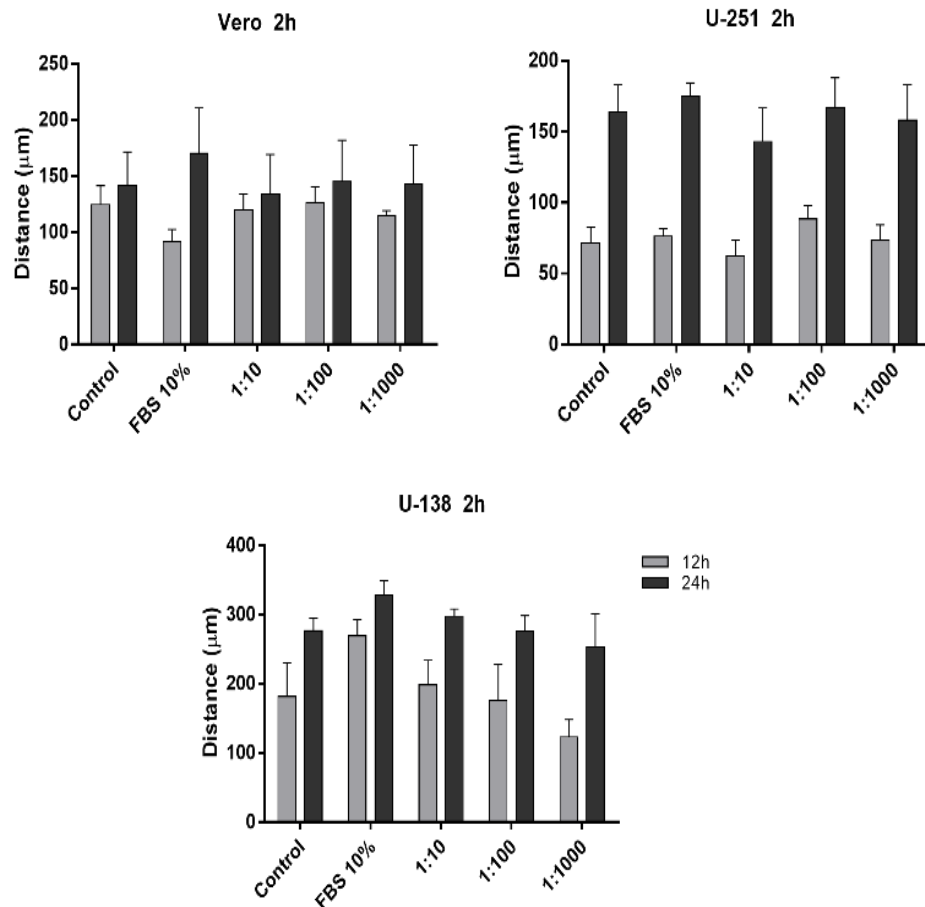
---

## Resultados



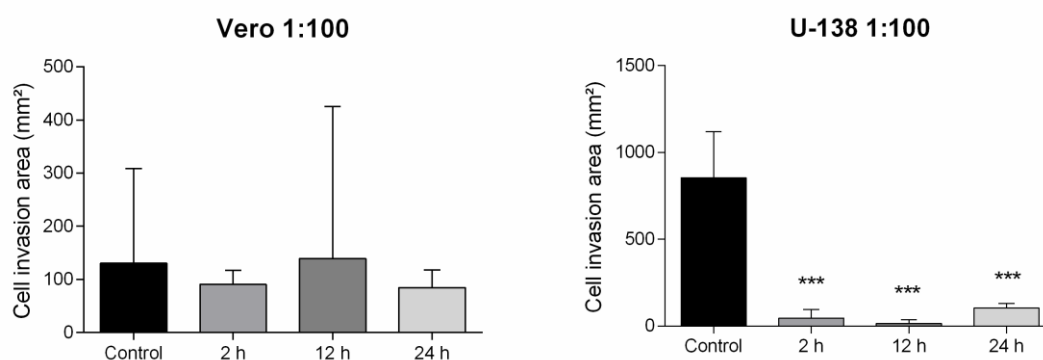
**Figura 2:** Análise de viabilidade celular, citotoxicidade e apoptose através do ensaio Triplex nos diferentes tempos e diluições do ZIKV. Os valores são expressos através da leitura da fluorescência para viabilidade e citotoxicidade e luminescência para apoptose.

O ensaio de migração celular não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa na distância entre as regiões em que as células migraram em nenhuma das diluições do ZIKV no período de exposição de 2 horas em comparação com as células não infectadas (controle). As células apresentaram um comportamento migratório semelhante inclusive quando comparado aos cultivos suplementados a 10% de soro. Nenhuma concentração foi capaz de causar alteração no potencial de migração celular das linhagens analisadas (Figura 3).



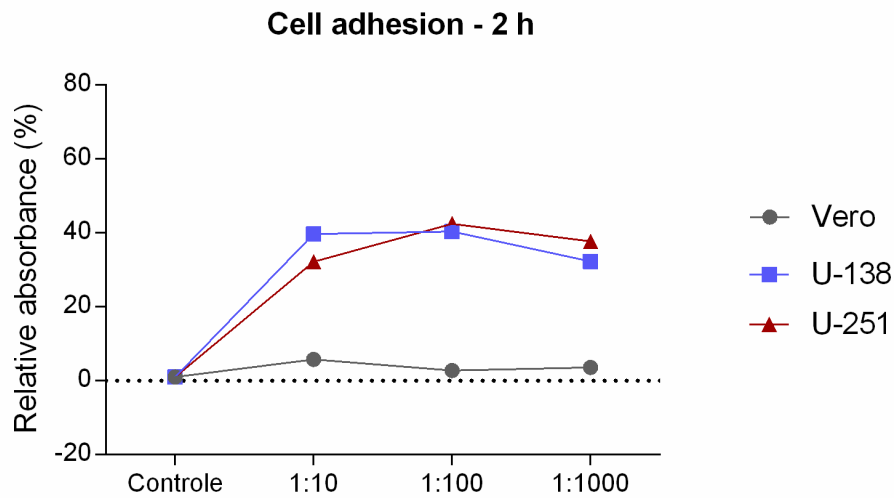
**Figura 3:** Ensaio de migração celular através da medida da distância entre as duas áreas contendo células. As capturas foram realizadas 12 horas e 24 horas após o início da análise. As medidas estão apresentadas em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de distância entre as extremidades contendo células e representam a capacidade de migração celular após a exposição a cada diferente diluição do ZIKV.

Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa na área referente as células que perfundiram ao longo do inserto no ensaio de invasão celular na linhagem controle Vero. Para linhagem de glioblastoma U-138, houve uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,005$ ) na capacidade de invasão celular mediada pela passagem através do poro de inserto nos três tempos analisados (2 horas, 12 horas e 24 horas) na diluição 1:100 do ZIKV. A área marcada correspondente a células que infiltraram ao longo do inserto na linhagem U-138 sem exposição ao ZIKV foi de 902,5 mm<sup>2</sup>. Após a exposição ao ZIKV, a área correspondente a células que infiltraram ao longo do inserto foi de 52,3 mm<sup>2</sup>, 18,1 mm<sup>2</sup> e 105,2 mm<sup>2</sup> para 2 horas, 12 horas e 24 horas de exposição respectivamente (Figura 4).



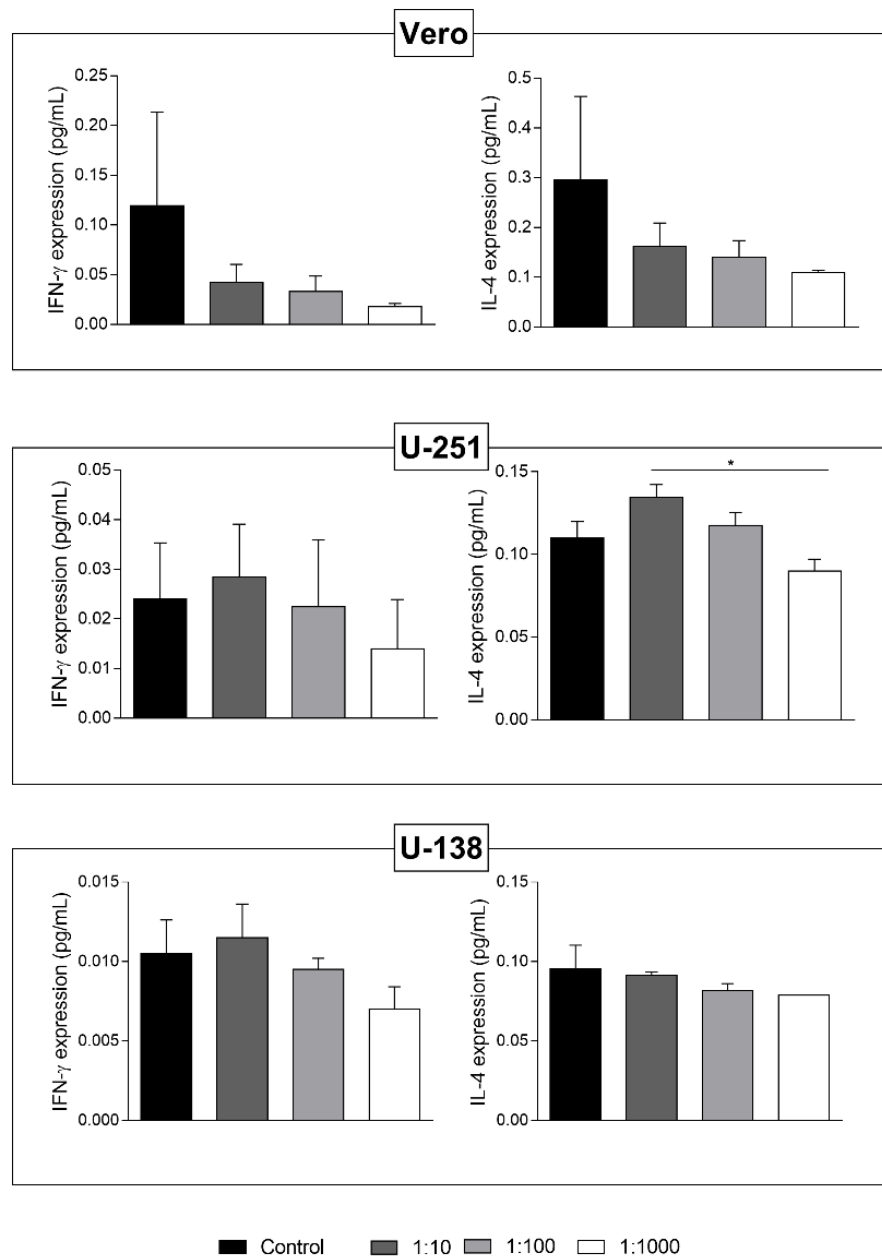
**Figura 4:** Análise do potencial de infiltração celular através de inserto. Os valores estão representados pela média da área total e desvio padrão de células marcadas pelo corante e retidas no inserto.

A exposição ao ZIKV aumentou o potencial de adesão das linhagens de glioblastoma U-138 e U-251. A linhagem Vero não sofreu nenhuma alteração no seu potencial de adesão celular após a exposição as três diferentes diluições do vírus. Para as linhagens de glioblastoma, 2 horas de exposição ao ZIKV promoveu um aumento da taxa de adesão celular nas três diferentes diluições, apresentando uma pequena redução nesta taxa de adesão na diluição 1:1000. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. A linhagem U-138 aumentou 32% a quantidade de células com potencial de adesão celular na diluição 1:10, 42% na diluição 1:100 e 38% na diluição 1:1000 do ZIKV quando comparado a mesma linhagem sem contato com o vírus. Na linhagem U-251, o aumento no potencial de adesão foi de 39% em 1:10, 40% em 1:100 e 32% em 1:1000 quando comparado a mesma linhagem não infectada (Figura 5).



**Figura 5:** Ensaio de adesão celular em Vero, U-138 e U-251 em células não infectadas (Controle) e células infectadas nas diferentes diluições do ZIKV. Os valores são representados pela absorbância das células aderidas nas placas e coradas com cristal violeta 0,5%.

A exposição ao ZIKV nas três diluições reduziu os níveis de expressão de INF- $\gamma$  e IL-4 na linhagem Vero após 2 horas de exposição em comparação ao controle não exposto. A linhagem U-251 após a exposição ao ZIKV por 2 horas, apresentou uma redução estatisticamente significativa da expressão de IL-4 na comparação da diluição 1:10 com a diluição 1:1000. A exposição do ZIKV a linhagem U-138 parece diminuir os níveis de INF- $\gamma$  após 2 horas de exposição quando comparado ao seu controle não exposto e manter-se estável em relação a IL-4. A diferença na redução de INF- $\gamma$  não foi estatisticamente significativa.



**Figura 6:** Imunoensaio para as interleucinas IL-4 e INF- $\gamma$  representados pela quantificação absoluta em picogramas por mL (pg/mL) através de comparação com curva padrão. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão.

A exposição ao ZIKV aumentou o percentual de células que expressaram CD14 na linhagem U-138 e U-251 quando comparada aos controles não expostos (Figura 6). O percentual de células U-138 marcadas para CD14 foi de 1,73% da população. Após 2 horas de exposição ao ZIKV, o percentual de células marcadas passou para 5,19% na diluição 1:10, 1,93% na 1:100 e 2,24% em 1:1000. Para linhagem U-251, as células não infectadas



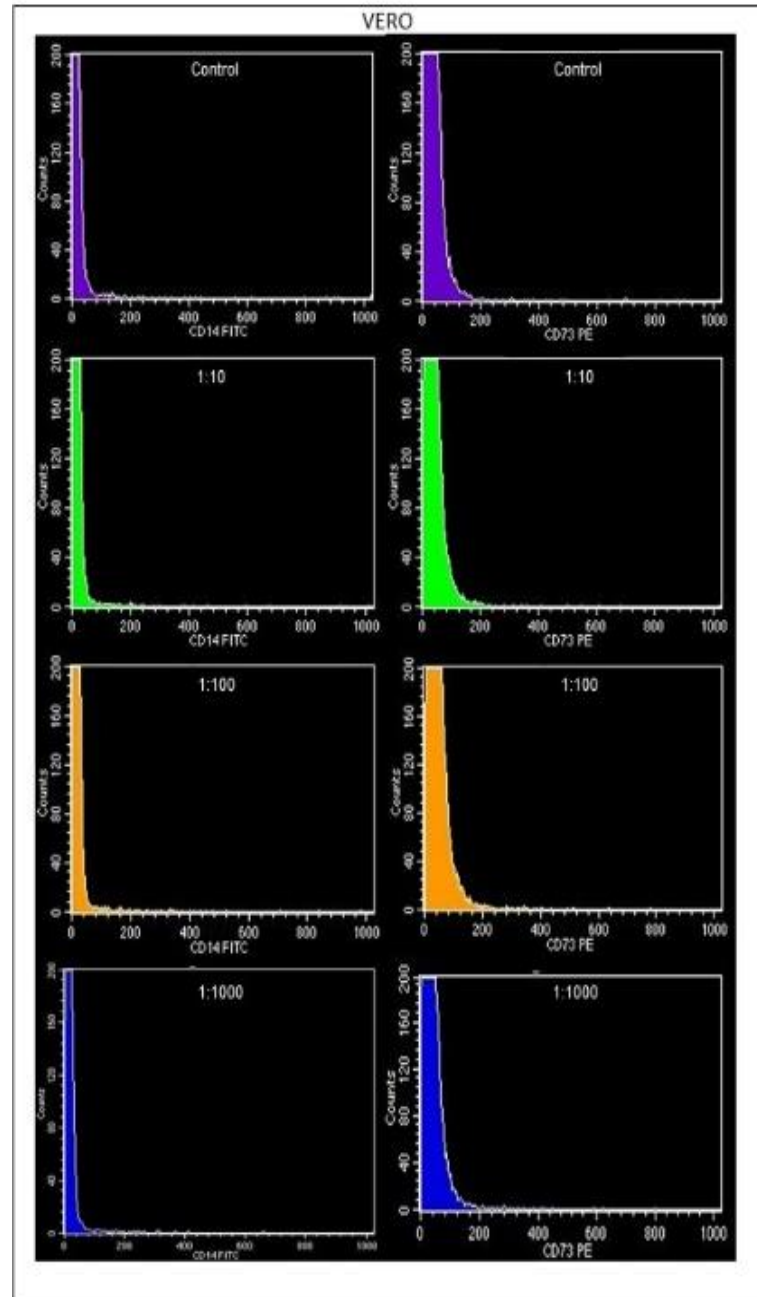
## *Resultados*

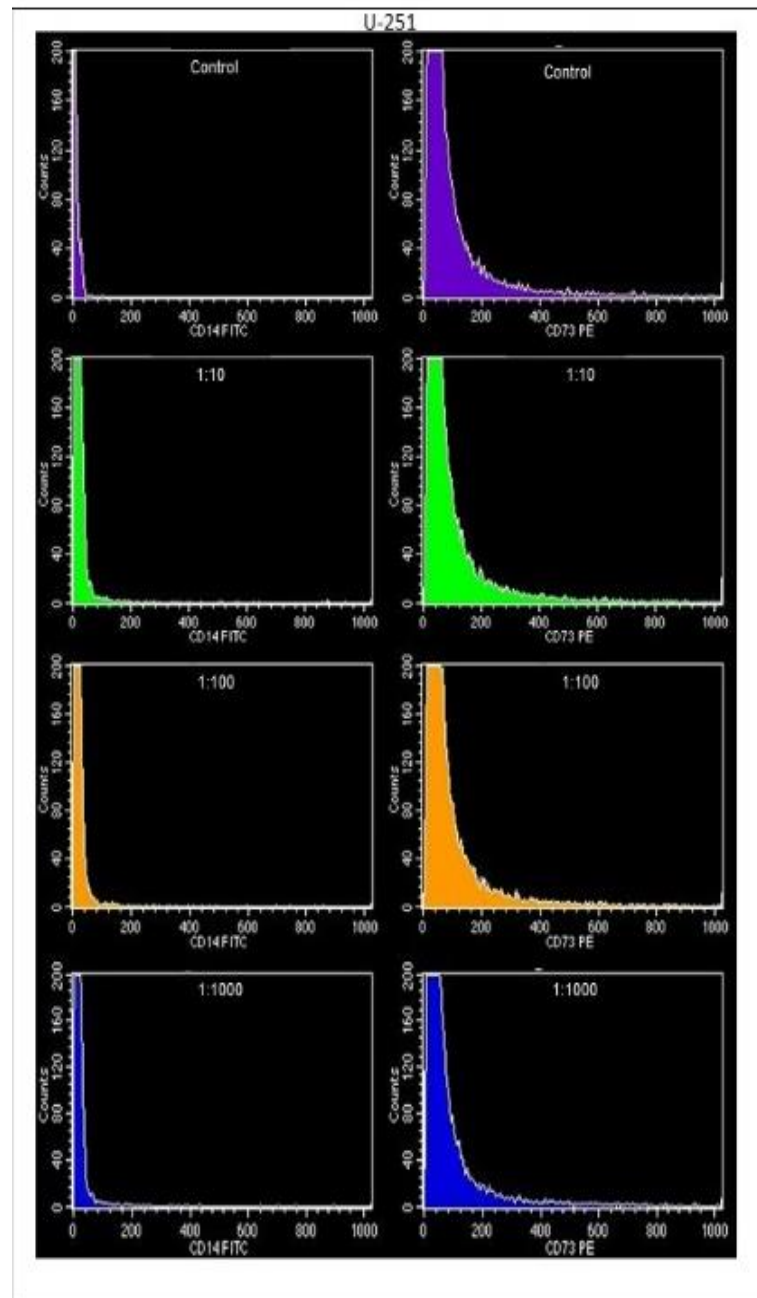
---

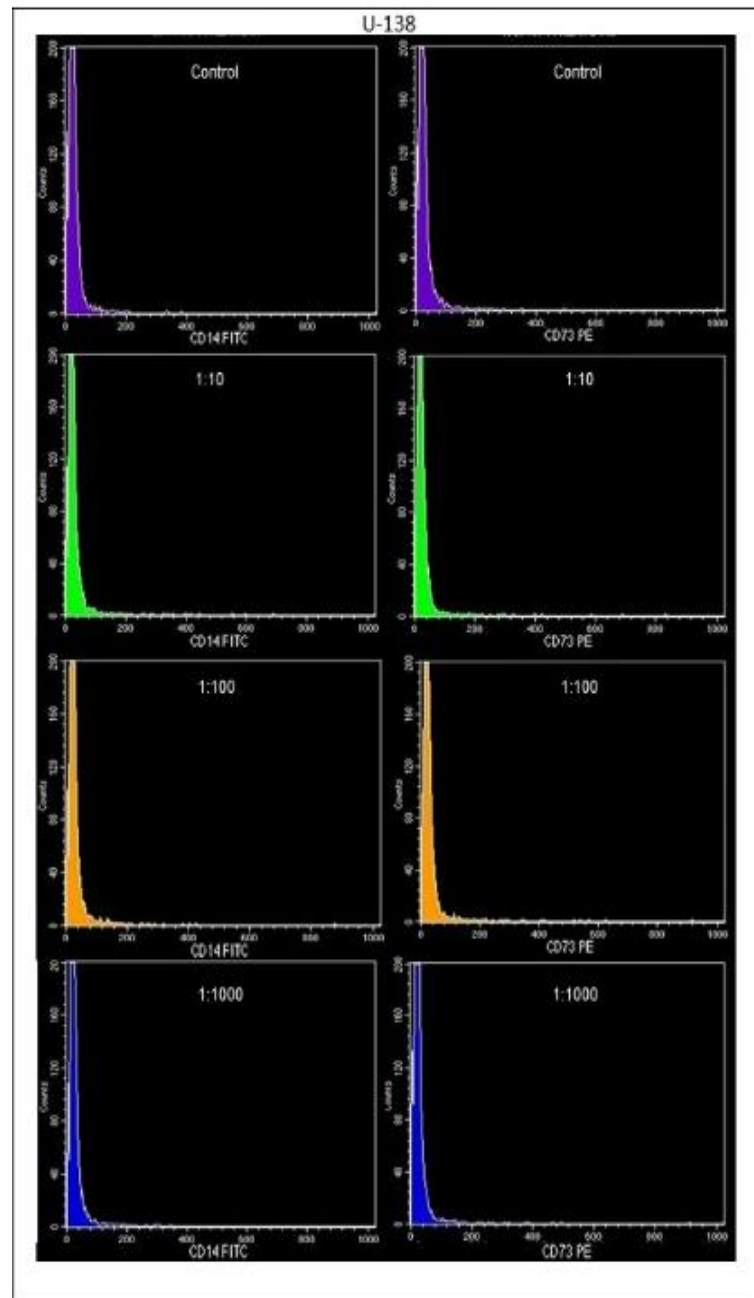
apresentaram um percentual de marcação de 1,84%, passando para 3,78% quando expostas a diluição 1:10, 3,71% em 1:100 e 3,08% na diluição 1:1000.

Houve um aumento estatisticamente significativo na expressão de CD73 na linhagem U-251 nas três diferentes diluições analisadas. O percentual de células marcadas na linhagem não infectada foi de 14,41%, passando para 25,8% após exposição ao ZIKV na diluição 1:10, 29,3% na diluição 1:100 e 30,4% na diluição 1:1000. Na linhagem U-138, não houve um aumento expressivo no percentual de células marcadas para CD73 após exposição as diferentes contrações do ZIKV (Figura 7).

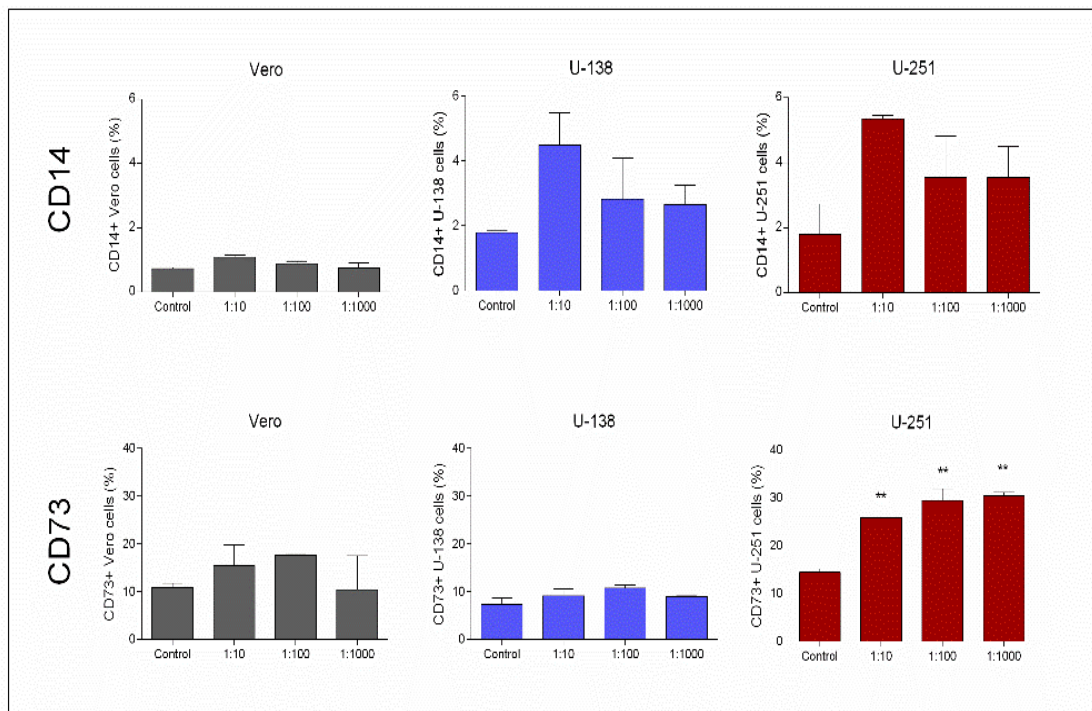
---



*Resultados*



**Figura 7:** Representação gráfica da citometria de fluxo após a exposição das linhagens ao ZIKAV. As imagens representam a quantidade de células marcadas para cada um dos marcadores de superfície.



**Figura 8:** Representação do perfil de expressão dos marcadores CD14 e CD73 através da representação da média e desvio padrão do percentual de células positivas para cada marcador de superfície após a exposição as diferentes diluições do ZIKV.

## 6 DISCUSSÃO

Podemos observar que após 2h de exposição ao ZIKV nas diluições 1:100 e 1:1000 houve uma redução da viabilidade celular apenas na linhagem de glioblastoma humano U-138. Ao analisarmos esse mesmo parâmetro pelo ensaio do Triplex, nenhuma alteração foi identificada para as três linhagens estudadas após a exposição ao vírus. Para a linhagem U-138, a toxicidade celular medida pelo ensaio MTT foi inversamente proporcional a quantidade de vírus em que as células foram expostas, sugerindo que a ação citotóxica do ZIKV nessa linhagem de glioblastoma tem maior eficiência quando há menor concentração de partícula viral por célula. Estudos atuais de replicação viral *in vitro* fornecem informações detalhadas sobre variáveis virológicas relacionadas a infecção, como a quantidade de vírus e o número de células-alvo medidas ao longo tempo, sendo extremamente difícil traduzir esses dados de forma quantitativa através dos parâmetros que identificam a cinética extremamente variável da infecção viral. Atualmente, estão disponíveis inclusive modelos matemáticos de valores baseados em parâmetros de diferentes vírus permitindo identificar as principais diferenças funcionais entre os vírus e entender as diferenças relacionadas à sua virulência e o curso diferenciado de tempo e quantidade de partícula viral nociva pós-infecção (25).

A variação dos resultados entre o MTT e o tríplex pode estar relacionada inicialmente a possíveis diferenças entre os protocolos utilizados. O MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) trata-se de um protocolo que avalia a viabilidade mitocondrial, sendo um indicador sensível da atividade metabólica celular. O ensaio baseia-se na redução de MTT, um corante de tetrazólio amarelo solúvel em água, principalmente pelas desidrogenases mitocondriais, a cristais de formazan de cor roxa. A quantidade de formazan (diretamente proporcional ao número de células viáveis) é medida registrando as alterações na absorbância a 570 nm, podendo assim diferenciar os níveis de viabilidade celular de diferentes populações

---

balizadas pela leitura da absorbância de um cultivo sem nenhuma intervenção ou tratamento (controle) (26). Já o Triplex baseia-se na atividade da protease de células vivas e intactas, sendo medida por um substrato peptídico chamado (glicil-fenilalanil-aminofluorocumarina GF-AFC). O substrato entra nas células intactas, onde é clivado pela atividade da protease das células vivas gerando um sinal fluorescente proporcional. Um segundo substrato (bis-alanilalanil-fenilalanil-rodamina 110 bis-AAF-R110) é utilizado para medir a atividade da protease de células mortas, que é emitido pelas células que perderam a integridade da membrana. As proteases de células vivas e mortas resultam em diferentes produtos que possuem diferentes espectros de excitação e emissão, permitindo que sejam detectados simultaneamente gerando valores de viabilidade e citotoxicidade celular na amostra analisada.

Em relação aos testes realizados para avaliar apoptose (Caspase 3 e 7), houve um aumento na taxa de apoptose nas duas linhagens celulares estudadas na diluição de 1:10 de ZIKV, em comparação às células não infectadas. Com esta mesma diluição, após 12 e 24 horas da exposição viral, não houve diferença na linhagem U-251 comparado ao controle e, na U-138, houve um aumento na taxa de apoptose após 12 horas de exposição viral, sendo que o mesmo não foi observado em 24 horas. Mesmo com maiores diluições, também foi observado um aumento na taxa de apoptose. Estes resultados podem levantar a hipótese de que a indução de apoptose pelo ZIKV pode iniciar nos primeiros momentos da infecção viral, se mantendo por períodos mais prolongados e que este efeito também ocorre com diluições menores, parecendo não ser dependente de maiores concentrações virais. Podemos ainda sugerir que as variações gênicas e fenotípicas entre as linhagens estudadas descrevem diferentes perfis de resposta à infecção ao ZIKV que podem estar alterando diferentes vias celulares induzindo morte celular por apoptose. Isso é corroborado, quando avaliamos os níveis de morte celular por apoptose na linhagem Vero, onde houve um aumento desse processo após 24h de exposição ao vírus nas três diluições avaliadas e na linhagem U-251 a indução de apoptose foi significativa

---

após 2h de exposição, apenas na forma mais concentrada do vírus (diluição 1:10). Já para a linhagem U-138 esse efeito foi mais proeminente, sendo observado após 2 e 12h de exposição na diluição 1:10. Sabe-se que o ZIKV apresenta uma predileção por células indiferenciadas e células neuronais pluripotentes, incluindo células tumorais desse mesmo tecido (22, 24). Kaid e colaboradores (2018), expuseram três diferentes linhagens de tumores cerebrais ao ZIKV e da mesma maneira, obtiveram diferentes intensidades na efetividade do vírus em reduzir o número de células. Além disso, eles também demonstraram uma predileção às células tumorais em relação a células progenitoras neurais, o que indica que o vírus apresenta uma seletividade a células cancerosas promovendo morte celular em diferentes intensidade (24).

Além da intensa proliferação celular característica do glioblastoma, seu perfil altamente invasivo e infiltrativo, o torna uma das malignidades mais difíceis de tratar, além disso essa doença se caracteriza por heterogeneidade celular, manutenção de células tronco tumorais, alterações genéticas como mutações, deleções e alterações epigenéticas que interferem em diferentes processos de sinalização intra-celular, além de alterações imunes do hospedeiro, levando ao raciocínio de que para a melhora de seu tratamento, devemos levar em considerações os mecanismos que possam estar mais relacionados com a manutenção do fenótipo maligno (2).

Nesse contexto, buscamos avaliar a capacidade do ZIKV em modular os processos de invasividade nas linhagens celulares de glioblastoma humano. No ensaio de *wound healing* que remete a um modelo de migração em blocos ou conjuntos celulares, não observamos qualquer alteração significativa após a exposição ao vírus, o que foi diferente do encontrado na literatura que descreve que o ZIKV reduz a capacidade migratória de células neuronais em desenvolvimento, porém este efeito em células tumorais ainda não é conhecido (23).

Já no protocolo de invasão celular com o uso dos insertos, observamos uma significativa redução da migração das células U-138 nos três tempos analisados e na diluição de 1:100 de

---



ZIKV, demonstrando neste estudo pré-clínico, um potencial a ser explorado em tumores, principalmente em tumores como o glioblastoma onde a capacidade de invasão aos tecidos cerebrais circunjacentes é uma das características principais desta neoplasia.

Por outro lado, observamos que após essas mesmas diluições e tempo de exposição ao ZIKV, houve um aumento na adesão celular, evidenciada somente nas linhagens tumorais. Os eventos de adesão e migração compõem juntos os processos de motilidade celular. Eventos sequenciais de ligação das integrinas a proteínas da matriz extracelular, associadas à protrusão do citoesqueleto, favorecem a migração individual das células, constituindo um movimento característico de fenótipos mesenquimais e de células tumorais, como os gliomas (Friedl & Wolf, 2010). Ao ocorrer um aumento da capacidade de adesão, essas células não conseguem se desligar tão rapidamente do substrato, havendo então uma redução da migração celular, como evidenciamos. A adesão entre as células, é um processo que ocorre normalmente nas células saudáveis. Em tumores, usualmente as proteínas que fazem esta adesão celular, tem sua expressão alterada, fazendo com que a adesão entre as células tumorais fique reduzida, permitindo, assim, o seu desprendimento para os tecidos circunvizinhos. No glioblastoma, isto é um dado extremamente interessante a ser observado, uma vez que esta doença tem como característica uma grande capacidade de se infiltrar nas áreas cerebrais adjacentes, o que a torna de difícil controle através da cirurgia e da radioterapia. Então, a capacidade de manter as células aderidas, dificultaria o processo de invasão local característico da doença. Dados na literatura mostram que o tratamento com ZIKV foi capaz de reduzir em 60% os níveis de metástase na medula espinhal, gerados após um implante de tumores cerebrais em modelos xenográficos com implante ortotópico (24). Logo, podemos inferir que a exposição ao ZIKV reduz a invasividade das células de glioma por induzir um aumento na adesão celular.

Além das integrinas, inúmeras outras moléculas participam do processo de adesão celular (27). Estudos mostram que a proteína CD73, é uma molécula reguladora nos processos

---

de proliferação, migração e invasão celular (8, 28) e ainda, estudos *in vitro* demonstraram que a desregulação de sua atividade, pode causar redução da adesão em linhagem celular de glioblastoma (29). Logo, o aumento da expressão de CD73 na linhagem U-251 pode corroborar com o aumento do potencial de adesão após a exposição as diferentes concentrações do ZIKV.

A CD73 é uma proteína ancorada à membrana plasmática por uma molécula de glicosilfosfatidilinositol, foi inicialmente descoberta na superfície de linfócitos estando associada ao processo de diferenciação dos mesmos, por isso é chamada de CD. Posteriormente foi atribuída a ela uma função enzimática, onde CD73 catalisa a hidrólise de AMP em adenosina no meio extracelular. Além de sua função enzimática como descrito acima, ela exerce funções como proteína de membrana auxiliando em processos de adesão e migração celular. Adicionalmente a CD73 é amplamente expressa em células com elevado grau de indiferenciação, sendo hoje uma das proteínas utilizadas como marcadoras de células mesenquimais (30). Diferentes tipos de tumores tais como câncer de mama, melanoma, gliomas e glioblastomas multiformes apresentam elevada expressão e atividade da CD73. Sua associação com a intensa capacidade proliferativa e invasiva destes tumores, permite que esta proteína de membrana seja sugerida como um marcador de elevado grau de malignidade tumoral (31). Sabendo que o ZIKV apresenta uma alta afinidade por células indiferenciadas de origem neural e também por células tumorais deste mesmo tecido e que a CD73 é uma proteína de membrana amplamente expressa nesses dois tipos celulares, podemos sugerir que a modulação da expressão dessa proteína pelo ZIKV nas linhagens celulares de glioblastoma pode caracterizar um importante mecanismo de ação, o qual modula a invasividade das células de glioblastoma via redução da expressão da CD73.

Com relação a proteína CD14, expressa preferencialmente em células do sistema imunológico, o achado de aumento de sua expressão nas linhagens celulares estudadas provavelmente deve-se ao fato de ser consequência do estímulo ao sistema imune, o que pode

---

representar uma informação importante, devido ao fato de que o glioblastoma é considerado um tumor não reativo em relação ao sistema imune, fato esse que tem dificultado a aquisição de bons resultados com a imunoterapia, que tem se apresentado muito promissora em outros tumores. O fato de estimular o sistema imunológico no microambiente tumoral, é uma informação inicial interessante, uma vez que tem sido estudada a combinação de tratamentos envolvendo vírus oncolíticos com imunoterapia, o que parece ser uma oportunidade para se investigar o impacto de combinar agentes imuno-estimuladores, como os vírus oncolíticos, com as estratégias de imunoterapia, efetivando a resposta imuno anti-tumoral (10).

A exposição por duas horas ao ZIKV aumentou a quantidade de INF- $\gamma$  na linhagem U-251 na diluição 1:10 quando comparado ao controle não infectado, reduzindo sua quantidade gradativamente com o aumento da diluição do vírus, não ocorrendo o mesmo na linhagem U-138 que se manteve com níveis semelhantes de INF- $\gamma$  quando comparado ao controle. Ari Kane e colaboradores demonstraram que o aumento de INF- $\gamma$  interrompe a proliferação do glioma, induz a apoptose, aumenta a imunogenicidade do tumor e inibe sua neovascularização. Esse aumento de INF- $\gamma$  mediado pela ação do ZIKV na diluição 1:10 na linhagem U-251 pode ser translacionado como uma adjuvante ferramenta para o tratamento do glioblastoma visto que é uma citocina que age em receptores de superfície celular, ativando a transcrição de genes que aumentam a imunogenicidade do tumor, interrompem mecanismos proliferativos e inibem a angiogênese do tumoral (32).

A linhagem U-138 também apresentou um aumento na expressão de IL-4 na concentração 1:10 e uma redução inclusive com níveis menores que o controle não infectado nas diluições 1:100 e 1:1000 após duas horas de exposição ao ZIKV. A IL-4 desempenha um papel crítico na regulação das respostas imunes e tem sido detectada em níveis elevados no microambiente tumoral de pacientes com câncer, onde as concentrações dessa interleucina se correlacionam com o grau de malignidade (33). Nesse sentido, as maiores diluições de

---

exposição ao ZikaV parecem exercer um papel de redução dos níveis de IL-4 na linhagem de glioblastoma U-138, podendo assim ser associadas a uma potencial redução no grau de malignidade dessa linhagem a partir da diluição 1:100.

O glioblastoma, por sua complexidade associada ao seu microambiente tumoral, é uma doença que se caracteriza pela pouca eficácia dos tratamentos atualmente disponíveis, inclusive com ausência de muitos alvos moleculares tumorais já estudados, bem como ausência de resposta significativa a imunoterapia. O conhecimento do funcionamento do microambiente tumoral, expressão gênica e alterações moleculares encontradas nesta patologia são cruciais para a exploração de novas modalidades de tratamento. O conhecimento que se tem hoje em relação ao uso de vírus oncolíticos, permite que se possa explorar esta forma de tratamento, utilizada isoladamente ou combinada com agentes quimioterápicos ou imunoterapia.

O ZIKV possui características bastante interessantes que potencialmente justificam seu uso para o tratamento de tumores cerebrais como glioblastoma devido aos seus mecanismos de ações já estudados em células neuronais pluripotentes como a indução de apoptose, redução da capacidade migratória de células neuronais e em desenvolvimento, bem como de seu potencial indutor do sistema imune do hospedeiro. Os resultados do nosso estudo confirmam algumas destas ações, a ainda indicam novos mecanismos envolvidos na interação do ZIKV as células tumorais de glioblastomas. Novos estudos devem ser conduzidos utilizando também modelos animais a fim de apresentar e definir lacunas como por exemplo, dose a ser utilizada, via de exposição ao agente viral, modificação genética do ZIKV para redução de efeitos sistêmicos da infecção viral, conduzindo assim a translação da metodologia de utilização do ZIKV para o tratamento de tumores cerebrais objetivando tornar seu uso mais factível e seguro em pesquisas envolvendo seres humanos.

---

## 7 CONCLUSÕES

A exposição de linhagens de glioblastoma U-251 e U-138 sob cultivo a diferentes diluições e tempo de exposição ao ZIKV permitiu concluir que:

1. Não houve alteração na viabilidade celular, mas houve aumento da apoptose;
  2. Não houve alteração na migração celular;
  3. A exposição ao ZIKV aumentou o potencial de adesão das duas linhagens de glioblastoma;
  4. Houve redução na expressão de IL-4 na linhagem U-251 após a exposição ao Zika por 2 horas, não havendo alteração em relação aos níveis de INF- $\gamma$ ;
  5. Houve aumento do percentual de células que expressaram o marcador de superfície CD14 na linhagem U-138 e U-251 e aumento da expressão de CD-73 na linhagem U-251.
-

## **8 PERSPECTIVAS**

Corroborando com resultados encontrados na literatura, apresentamos aqui mecanismos de ação não lítica do ZIKV sob cultivo de linhagens de glioblastoma U-251 e U-138. O conjunto de alterações encontradas como aumento da expressão de CD73, aumentando o potencial de adesão celular, não influenciando na migração mas reduzindo sua capacidade invasiva, aumentando também a apoptose, pode manter o tumor estático, reduzindo sua capacidade invasiva *in loco*, sendo um alvo mais suscetível ao tratamento quimioterápico, radioterápico ou cirúrgico. Após diversos avanços necessários relacionados à segurança e factibilidade do uso de terapia com ZIKV para o tratamento de glioblastoma podemos sugerir que essa terapia deva ser explorada como potencial agente no tratamento atual desta doença.

---

**9 REFERÊNCIAS**

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;352(10):987-96.
  2. Cai X, Sughrue ME. Glioblastoma: new therapeutic strategies to address cellular and genomic complexity. *Oncotarget*. 2018;9(10):9540-54.
  3. Dunwoodie LJ, Poehlman WL, Ficklin SP, Feltus FA. Discovery and validation of a glioblastoma co-expressed gene module. *Oncotarget*. 2018;9(13):10995-1008.
  4. Frei K, Gramatzki D, Tritschler I, Schroeder JJ, Espinoza L, Rushing EJ, et al. Transforming growth factor-beta pathway activity in glioblastoma. *Oncotarget*. 2015;6(8):5963-77.
  5. Lim M, Xia Y, Bettegowda C, Weller M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nature reviews Clinical oncology*. 2018;15(7):422-42.
  6. Park IH, Kong SY, Ro JY, Kwon Y, Kang JH, Mo HJ, et al. Prognostic Implications of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Association With Programmed Death Ligand 1 Expression in Early-Stage Breast Cancer. *Clinical breast cancer*. 2016;16(1):51-8.
  7. Reardon DA, Freeman G, Wu C, Chiocca EA, Wucherpennig KW, Wen PY, et al. Immunotherapy advances for glioblastoma. *Neuro-oncology*. 2014;16(11):1441-58.
  8. Azambuja JH, Gelsleichter NE, Beckenkamp LR, Iser IC, Fernandes MC, Figueiro F, et al. CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth. *Molecular neurobiology*. 2018.
  9. Zhao J, Chen AX, Gartrell RD, Silverman AM, Aparicio L, Chu T, et al. Immune and genomic correlates of response to anti-PD-1 immunotherapy in glioblastoma. *Nature medicine*. 2019.
  10. Lawler SE, Speranza MC, Cho CF, Chiocca EA. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA oncology*. 2017;3(6):841-9.
  11. Wheeler LA, Manzanera AG, Bell SD, Cavaliere R, McGregor JM, Grecula JC, et al. Phase II multicenter study of gene-mediated cytotoxic immunotherapy as adjuvant to surgical resection for newly diagnosed malignant glioma. *Neuro-oncology*. 2016;18(8):1137-45.
  12. Huang TT, Parab S, Burnett R, Diago O, Ostertag D, Hofman FM, et al. Intravenous administration of retroviral replicating vector, Toca 511, demonstrates therapeutic efficacy in orthotopic immune-competent mouse glioma model. *Human gene therapy*. 2015;26(2):82-93.
  13. Cloughesy TF, Landolfi J, Hogan DJ, Bloomfield S, Carter B, Chen CC, et al. Phase 1 trial of vocimagene amiretrorepvec and 5-fluorocytosine for recurrent high-grade glioma. *Science translational medicine*. 2016;8(341):341ra75.
-

14. Nakashima H, Nguyen T, Kasai K, Passaro C, Ito H, Goins WF, et al. Toxicity and Efficacy of a Novel GADD34-expressing Oncolytic HSV-1 for the Treatment of Experimental Glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2018;24(11):2574-84.
  15. Desjardins A, Gromeier M, Herndon JE, 2nd, Beaubier N, Bolognesi DP, Friedman AH, et al. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *The New England journal of medicine*. 2018;379(2):150-61.
  16. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *The New England journal of medicine*. 2016;374(10):951-8.
  17. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. *The New England journal of medicine*. 2016;374(16):1552-63.
  18. Chimelli L, Melo ASO, Avvad-Portari E, Wiley CA, Camacho AHS, Lopes VS, et al. The spectrum of neuropathological changes associated with congenital Zika virus infection. *Acta neuropathologica*. 2017;133(6):983-99.
  19. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. 2016;352(6287):816-8.
  20. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell stem cell*. 2016;18(5):587-90.
  21. Gabriel E, Ramani A, Karow U, Gottardo M, Natarajan K, Gooi LM, et al. Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids. *Cell stem cell*. 2017;20(3):397-406 e5.
  22. Zhu Z, Gorman MJ, McKenzie LD, Chai JN, Hubert CG, Prager BC, et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *The Journal of experimental medicine*. 2017;214(10):2843-57.
  23. Wang J, Liu J, Zhou R, Ding X, Zhang Q, Zhang C, et al. Zika virus infected primary microglia impairs NPCs proliferation and differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;497(2):619-25.
  24. Kaid C, Goulart E, Caires-Junior LC, Araujo BHS, Soares-Schanoski A, Bueno HMS, et al. Zika Virus Selectively Kills Aggressive Human Embryonal CNS Tumor Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer research*. 2018;78(12):3363-74.
  25. Iwami S, Sato K, De Boer RJ, Aihara K, Miura T, Koyanagi Y. Identifying viral parameters from in vitro cell cultures. *Frontiers in microbiology*. 2012;3:319.
  26. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD)2004.
-



27. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of cell biology*. 2010;188(1):11-9.
  28. Zhang B. CD73: a novel target for cancer immunotherapy. *Cancer research*. 2010;70(16):6407-11.
  29. Cappellari AR, Vasques GJ, Bavaresco L, Braganhol E, Battastini AM. Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in U138MG glioma cell adhesion. *Molecular and cellular biochemistry*. 2012;359(1-2):315-22.
  30. Calloni R, Cordero EA, Henriques JA, Bonatto D. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. *Stem cells and development*. 2013;22(9):1455-76.
  31. Soleimani A, Taghizadeh E, Shahsavari S, Amini Y, Rashidpour H, Azadian E, et al. CD73; a key ectonucleotidase in the development of breast cancer: Recent advances and perspectives. *Journal of cellular physiology*. 2019.
  32. Kane A, Yang I. Interferon-gamma in brain tumor immunotherapy. *Neurosurgery clinics of North America*. 2010;21(1):77-86.
  33. Nappo G, Handle F, Santer FR, McNeill RV, Seed RI, Collins AT, et al. The immunosuppressive cytokine interleukin-4 increases the clonogenic potential of prostate stem-like cells by activation of STAT6 signalling. *Oncogenesis*. 2017;6(5):e342.
-

**ANEXOS****ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMISSÃO CIENTÍFICA**

**SIPESQ**  
Sistema de Pesquisas da PUCRS

---

Código SIPESQ: 8249

Porto Alegre, 3 de outubro de 2017.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica do INSTITUTO DO CÉREBRO DO RS da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "AVALIAÇÃO DO TROPISMO E AÇÃO DO ZIKA VÍRUS EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOBLASTOMA".

Atenciosamente,

Comissão Científica do INSTITUTO DO CÉREBRO DO RS

---

## ANEXO B - APROVAÇÃO SISGEN



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO  
**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
 Cadastro nº A708680

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A708680**  
 Usuário: **UBEA**  
 CPF/CNPJ: **88.630.413/0001-09**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

**Espécie**

Zika

Título da Atividade: **Avaliação do tropismo e ação do Zika Vírus em linhagem celular de glioblastoma**

**Equipe**

Jaderson Costa Da Costa	UBEA
Fabiana Spillari Viola	UBEA-PUCRS
Daniel Rodrigo Marinowic	UBEA-PUCRS
Gabriele Goulart Zanirati	UBEA-PUCRS
Ângela Zanatta	UBEA-PUCRS
Denise Cantarelli Machado	UBEA-PUCRS
Angélica Regina Cappellari	UBES-PUCRS
Fernanda Bueno Morrone	UBEA-PUCRS

Data do Cadastro: **23/10/2018 17:11:02**  
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 17:11 de 23/10/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**