

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

BRUNA BARRETO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DA EXCITABILIDADE HIPOCAMPAL EM MODELO DE
INFECÇÃO PERINATAL PELO VÍRUS DA ZIKA: PADRONIZAÇÃO DOS
REGISTROS DE CAMPO**

RIO DE JANEIRO

2025

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

BRUNA BARRETO DA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy” como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Isis Nem de Oliveira Souza

RIO DE JANEIRO
2025

BRUNA BARRETO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DA EXCITABILIDADE HIPOCAMPAL EM MODELO DE
INFECÇÃO PERINATAL PELO VÍRUS DA ZIKA: PADRONIZAÇÃO DOS
REGISTROS DE CAMPO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy” como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isis Nem de Oliveira Souza

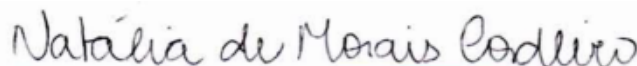
Aprovada em:

Rio de Janeiro, 27 de novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **ISIS NEM DE OLIVEIRA SOUZA**
Data: 02/12/2025 09:43:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Isis Nem de Oliveira Souza
orientadora



Prof^a. Dr^a. Natália de Moraes Cordeiro

Documento assinado digitalmente
 **HENRIQUE ROCHA MENDONÇA**
Data: 03/12/2025 13:39:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Henrique Rocha Mendonça

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Ana, minha melhor amiga e minha fortaleza. Obrigada por ser o meu porto seguro em todas as tempestades, por acreditar em mim quando eu nem sabia por onde começar e por me mostrar que mulheres podem ocupar o lugar que quiserem. Por cada palavra de incentivo, por ouvir minhas preocupações e por estar sempre disposta a preparar um chimarrão e dividir comigo o silêncio ou uma risada. Nada disso seria possível sem o teu amor que me guia e me sustenta.

Ao meu pai, Edison, por acreditar em mim e achar que eu sou a pessoa mais inteligente. Por ser o mais ansioso com as minhas visitas, por sempre preparar o melhor churrasco gaúcho do mundo e por me ensinar, com gestos simples, o significado mais bonito do amor: o de torcer, vibrar e acreditar. Contigo eu aprendi, não só a amar as nossas tradições, mas também a garra e a força.

Aos meus irmãos, Lucas e Daniel, obrigada pelas risadas que curam, pela implicância e pelos momentos de leveza que tornam a vida mais colorida. Mesmo longe, vocês estão sempre presentes, vibrando com as minhas conquistas, me apoiando nas escolhas e compartilhando as quedas e vitórias como se fossem de vocês. A vida, sem dúvida, seria mais escura sem as nossas risadas de doer a barriga.

À minha vó, Doralina, que já não está aqui para ver a conclusão de mais uma etapa da minha vida, mas está em tudo o que eu sou. A senhora me ensinou as lições mais valiosas: o amor, a fé e a força. Não deu tempo de ver a formatura, nem de conhecer o Rio, mas a senhora me acompanha em cada passo. Esse sonho também é seu, vó.

Ao meu vô, Waldir, que mesmo sem dizer uma palavra, transborda amor em cada gesto. Que se emociona e nunca mede esforços para ver a neta preferida voar alto e conquistar o mundo. Obrigada por ser exemplo de força e carinho. Por me lembrar, em silêncio, que o amor verdadeiro não precisa de muitas palavras para ser imenso.

À minha amiga, Stefany, obrigada por estar sempre por perto, por torcer por mim com tanta força e por me lembrar, nos dias difíceis, do quanto eu sou capaz. Por ser esse poço sem fim de sentimentalismos que às vezes me faz rir, às vezes me faz chorar, mas sempre me faz sentir amada. Pelas conversas infinitas, pelas memórias que aquecem e por me lembrar constantemente do meu valor, mesmo quando eu esqueço. Você é uma das pessoas mais especiais que a vida colocou no meu caminho.

À minha orientadora, minha “mamis” acadêmica, obrigada por ser mais do que uma mentora e por ser abrigo em meio ao caos. Por transformar o laboratório num espaço seguro e leve. Por acalmar o furacão que eu sou, por entender o meu jeito, por me dar espaço para crescer e por confiar em mim no processo. Obrigada por acreditar, mesmo quando eu mesma achava que não ia dar certo. Você faz a diferença e a tua generosidade marca não só a minha trajetória, mas a de todos que têm a sorte de cruzar teu caminho.

Às minhas colegas, minhas irmãs de jaleco, de risadas e de coração. Sem vocês, a caminhada teria sido pesada demais. Obrigada por estarem ali em cada madrugada cansada, em cada crise de riso ou de choro, em cada desabafo entre experimentos e por todos os cafés com palhaçadinhas.

À Mari, minha dupla perfeita de experimentos e a melhor que alguém poderia ter. Obrigada por me acolher desde o início, mesmo me mandando embora do Rio três vezes por dia. Pela empatia, delicadeza e carinho. Pelos abraços, pela parceria e até pelas roupas combinando sem querer. Contigo até os dias mais caóticos se tornavam leves.

À Carol, minha parceira de personalidade e de sinceridade. Duplinha de grosserias, mas também de muito amor. Obrigada pelas risadas, pelos deboches, pela força e por estar sempre ali, do meu lado, acreditando em mim, mesmo quando eu estava prestes a desistir. Contigo até o cansaço de um dia inteiro de experimentos virava riso.

Ao professor Newton, pela paciência infinita e pela generosidade em compartilhar conhecimento. Obrigada pelas conversas, pelos conselhos e por vibrar de verdade com cada conquista. É inspirador ver alguém ensinar com tanto coração.

Ao LFM, professores e alunos, obrigada pelo acolhimento, pelas risadas e pela leveza que tornaram o laboratório um segundo lar, vocês são incríveis e é uma honra fazer parte dessa família acadêmica. Ao Laboratório de Resposta Celular à Infecções Virais, pela colaboração. À UFRJ e à Unigranrio, por contribuírem de forma essencial para a minha formação e por serem parte desse sonho.

Às agências de fomento FAPERJ, CNPq, ISN e IBRO por tornarem essa pesquisa possível e, junto com ela, a realização de um pedaço importante da minha história.

Por fim, obrigada à vida, por me colocar cercada de pessoas tão incríveis, por me permitir crescer, errar, aprender e chegar até aqui. Esse trabalho é feito de ciência, mas também de amor, amizade, paciência, fé, resiliência e de todos que acreditaram em mim e é a vocês que eu dedico, com todo meu coração.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do hipocampo de camundongo	Erro!
Indicador não definido.	
Figura 2: Posicionamento dos eletrodos de estímulo e registro na via sináptica Schaffer-CA1	17
Figura 3: Representação da região analisada para amplitude e slope dos EPSPs ..	18
Figura 4: Curva entrada-saída da via Schaffer-CA1 de fatias frescas de hipocampo de camundongos adultos	19
Figura 5: Razão da PPF em diferentes intensidades de estímulo na via sináptica Schaffer-CA1	20
Figura 6: Relação entre a intensidade de estímulo e a amplitude dos EPSPs da via sináptica Schaffer-CA1	21
Figura 7: Relação entre a intensidade de estímulo e a razão da PPF da via sináptica Schaffer-CA1	22
Figura 8: Relação entre a intensidade e a inclinação da reta (slope) dos EPSPs.....	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 METODOLOGIA.....	13
2. 1. ACASALAMENTOS, DESMAMES E ANIMAIS	13
2. 2. SOLUÇÕES	14
2. 3. OBTENÇÃO DE FATIAS AGUDAS DE HIPOCAMPO	15
2. 4. <i>SETUP</i> DE ELETROFISIOLOGIA E ELETRODOS.....	16
2. 5. REGISTRO E ANÁLISE DE DADOS	17
3 RESULTADOS	18
4 DISCUSSÃO.....	23
5 CONCLUSÃO.....	26

CARACTERIZAÇÃO DA EXCITABILIDADE HIPOCAMPAL EM MODELO DE INFECÇÃO PERINATAL PELO VÍRUS DA ZIKA: PADRONIZAÇÃO DOS REGISTROS DE CAMPO

Bruna Barreto da Silva¹

Isis Nem de Oliveira Souza²

RESUMO

O vírus da Zika é um arbovírus que ganhou notoriedade após a epidemia de 2015-2016 nas Américas, devido ao seu impacto na saúde pública, principalmente em fetos expostos durante a gestação. Além das manifestações neurológicas precoces apresentadas ao nascimento, podem surgir complicações tardias, como a epilepsia. Entretanto, ainda permanece incerto como a infecção afeta a conectividade neuronal e quais são os mecanismos que culminam na epilepsia. Portanto, o objetivo do estudo foi padronizar registros de campo (*field*) a fim de posteriormente verificar a excitabilidade neuronal no hipocampo por meio da exposição neonatal de camundongos Swiss ao vírus da Zika. Para isso, foram obtidas fatias agudas de hipocampo para registros eletrofisiológicos de campo na região CA1, a partir da estimulação elétrica das fibras colaterais de Schaffer. Visando padronizar a técnica e as intensidades de estimulação utilizadas, os experimentos foram feitos com camundongos adultos saudáveis. Os potenciais excitatórios pós-sinápticos obtidos foram analisados quanto a amplitude, inclinação da reta e facilitação de pulso pareado, onde foi possível ver um aumento dependente da intensidade de estímulo (0.1-1.5 mA). A padronização da técnica e das soluções garantiram registros consistentes e compatíveis com a literatura, demonstrando que os parâmetros empregados são adequados para investigar possíveis alterações na excitabilidade hipocampal decorrentes da infecção neonatal pelo vírus da Zika. Esses resultados contribuem para a formação de uma base para futuros estudos sobre os mecanismos neurofisiológicos associados às manifestações epileptiformes relacionadas ao vírus.

Palavras-chave: flavivírus; hipocampo; eletrofisiologia; excitabilidade neuronal; epilepsia.

ABSTRACT

The Zika virus is an arbovirus that gained notoriety after the 2015-2016 epidemic in the Americas due to its impact on public health, mainly in fetuses exposed during gestation. In addition to early neurological manifestations presented at birth, late complications such as epilepsy can arise. However, it remains uncertain how the infection affects neuronal connectivity and what mechanisms culminate in epilepsy. Therefore, the aim of this study was to standardize field recordings in order to subsequently verify neuronal excitability in the hippocampus through neonatal exposure of Swiss mice to the Zika virus. To this end, acute hippocampal slices were obtained for electrophysiological field recordings in the CA1 region, from electrical stimulation of Schaffer collateral fibers. In order to standardize the technique and stimulation intensities used, the experiments were performed with healthy adult mice. The excitatory postsynaptic potentials obtained were analyzed for amplitude, slope of the line, and paired pulse facilitation, where an increase dependent on stimulus intensity (0.1-1.5 mA) was observed. Standardization of the technique and solutions ensured consistent recordings compatible with the literature, demonstrating that the parameters employed are adequate to investigate possible alterations in hippocampal excitability resulting from neonatal Zika virus infection. These results contribute to the formation of a basis for future studies on the neurophysiological mechanisms associated with epileptiform manifestations related to the virus.

Keywords: flavivirus; hippocampus; electrophysiology; neuronal excitability; epilepsy.

¹ Graduanda do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

² Doutora em Ciências Farmacêuticas - UFRJ

1 INTRODUÇÃO

O vírus da Zika (ZIKV), responsável pela epidemia de 2015-2016 no território brasileiro, é um vírus de RNA de fita simples, da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*. Possui entre 42 e 52 nm de diâmetro e um envelope composto de bicamada lipídica e 180 glicoproteínas que se ligam a vários receptores de membrana (Dias *et al.*, 2018). O ZIKV é transmitido majoritariamente por meio de picadas de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*, sendo no Brasil, pela espécie *Aedes aegypti* (Padilha *et al.*, 2018; Possas, 2016). Contudo, sua transmissão também pode ocorrer por meio do contato sexual, transfusões de sangue e transmissão vertical (Albuquerque *et al.*, 2018; Foy *et al.*, 2011; Magnus *et al.*, 2018; Musso *et al.*, 2015).

Identificado pela primeira vez na floresta Zika na Uganda, África Ocidental, em 1947, houve apenas poucos registros de casos isolados na África e Ásia (Dick; Kitchen; Haddow, 1952; Duffy *et al.*, 2009). O primeiro grande surto da doença foi em 2007 na ilha Yap, Estados Federados da Micronésia, com 73% da população infectada (Duffy *et al.*, 2009). Tal fato indicou a circulação do vírus fora dos continentes asiático e africano. Em seguida, em 2013, foi relatado um novo surto do vírus, dessa vez na Polinésia Francesa, infectando cerca de 66% da população local (Cauchemez *et al.*, 2016). No entanto, esse cenário ganhou ainda mais força em 2015, quando ocorreu uma nova epidemia que afetou países da América do Sul e Central (Hennessey; Fischer; Staples, 2016; Zanluca *et al.*, 2015). Com a gravidade e alta circulação do vírus, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou, em 1º de fevereiro de 2016, a epidemia de ZIKV como uma Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional (World Health Organization, 2016).

Segundo dados do Ministério da Saúde, o Brasil registrou, em 2015, cerca de 50 mil casos de infecção pelo ZIKV e, em 2016, mais de 200 mil casos, sendo esses, em sua maioria, na região Nordeste do território nacional (Ministério da Saúde, 2017). Mostrou também uma incidência maior nos estados do Centro Oeste (188,1 casos/100 mil habitantes) e Nordeste (127,7 casos/100 mil habitantes). Dentre os estados, destacaram-se Mato Grosso (652,9 casos/100 mil habitantes), Rio de Janeiro (363,6 casos/100 mil habitantes) e Bahia (328,2 casos/100 mil habitantes) (Ministério da Saúde, 2017). No entanto, o número de casos reais, no continente americano, seria ainda maior que o divulgado pelas autoridades uma vez que grande parte dos

infectados são assintomáticos ou possuem sintomas leves (60% a 80%) e confundíveis com outras arboviroses (Duffy *et al.*, 2009).

A sintomatologia acerca da infecção por ZIKV em adultos contempla febre baixa, artralgia (dor nas articulações), mialgia (dor muscular) e conjuntivite não purulenta, com duração de dias a uma semana (Hennessey; Fischer; Staples, 2016). Correlacionando-se ao aumento das infecções, houve um pico de casos de Síndrome de Guillain-Barré em 2015 comparado com 2014 (Possas, 2016). Essa neuropatia periférica leva a fraqueza muscular e paralisia, com duração média de dias ou semanas e, em casos mais graves, paralisia total causando a morte (Possas, 2016). Já a infecção durante a gestação pode levar a graves lesões cerebrais no feto, como microcefalia, calcificações no tecido cerebral, distúrbios visuais, motores, cognitivos e sensoriais, epilepsia, transtorno do espectro autista e outras anomalias congênitas (Chan *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2017; Musso; Ko; Baud, 2019; Roth *et al.*, 2023; Santi *et al.*, 2021; van der Linden *et al.*, 2018). Muitos desses comprometimentos não são detectáveis ao nascimento e caracterizam um conjunto de manifestações denominada de Síndrome Congênita do Zika (SCZ) (Frota *et al.*, 2020).

Devido a semelhança dos sintomas e a possibilidade de diagnóstico cruzado com outros arbovírus endêmicos no Brasil, como a Dengue (DENV) e a Chikungunya (CHIKV), os sinais clínicos isoladamente não são suficientes para o diagnóstico da infecção por ZIKV (Dias *et al.*, 2018; Fauci; Morens, 2016). Portanto, sendo necessário o uso de métodos laboratoriais para confirmação. Exames sorológicos, baseados na detecção de anticorpos contra o vírus em amostras de sangue, urina, sêmen, entre outros fluídos biológicos e a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) durante a fase aguda da viremia para a identificação do RNA viral, são os principais métodos de diagnóstico da infecção (Dias *et al.*, 2018). Além de outros exames sorológicos como ELISA e anticorpos neutralizantes, esse último sendo mais específico e utilizado para diferenciação de infecção por ZIKV e demais infecções por outros arbovírus endêmicos, como DENV (Chan *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2018).

Em grávidas com suspeita de infecção por ZIKV ou com diagnóstico confirmado, o monitoramento fetal é feito por meio de ultrassonografia. Caso sejam encontradas alterações cerebrais, o recomendado é continuar o acompanhamento do feto através de neurosonografia fetal e ressonância magnética (Araujo *et al.*, 2017; Santana *et al.*, 2021). Já no pós-parto, utiliza-se tomografia computadorizada e ultrassonografia transfontanelar, possibilitando localizar deformidades ósseas craniofaciais no bebê

(Santana *et al.*, 2021). Acerca do tratamento, ainda não existem medicamentos ou vacinas eficazes contra o ZIKV, tornando a prevenção, até o momento, o mais indicado contra o vírus (Santana *et al.*, 2021). Ações como utilizar telas nas janelas, repelentes, uso de preservativos, uso de roupas compridas e manejo de focos do mosquito, são medidas recomendadas pelas autoridades sanitárias (Chan *et al.*, 2016; PAHO, 2015; Santana *et al.*, 2021). Apesar do diagnóstico e das estratégias de prevenção, o manejo clínico das complicações associadas à infecção congênita pelo ZIKV ainda representa um grande desafio. Entre essas complicações, destaca-se a SCZ, frequentemente associada a distúrbios neurológicos graves, como a epilepsia. A escassez de opções terapêuticas eficazes e a alta incidência de crises epiléticas em crianças com SCZ, superiores às demais infecções congênitas que afetam o sistema nervoso, tornam indispensável a busca por novos alvos terapêuticos (Maia *et al.*, 2021).

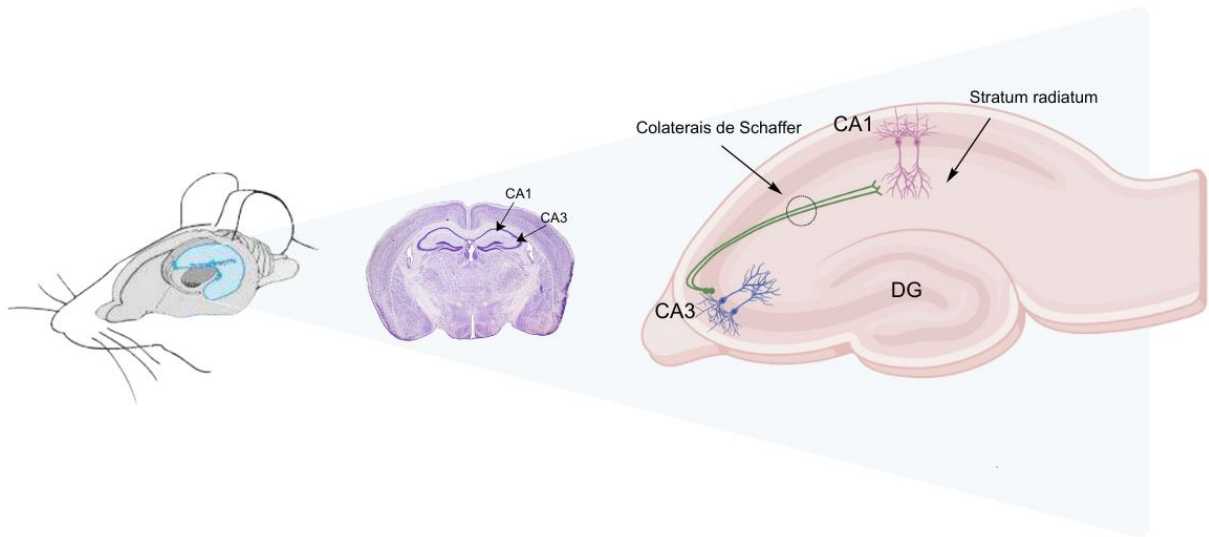
Segundo a Liga Internacional Contra a Epilepsia (Fisher *et al.*, 2014, p. 2), a epilepsia “é uma afeção cerebral caracterizada por uma predisposição mantida para gerar crises epiléticas e suas consequências”, com a ocorrência de, no mínimo, uma crise epilética. Essas crises são descritas como manifestações resultantes de uma atividade neuronal excessiva ou síncrona (Fisher *et al.*, 2014). Estima-se que cerca de 50 milhões de pessoas sejam afetadas por essa doença no mundo, e aproximadamente 80% vivem em países subdesenvolvidos (World Health Organization, 2019). Um estudo feito em 2020 com 91 crianças diagnosticadas com microcefalia associada a infecção pelo ZIKV, acompanhadas até os dois anos de idade, constatou que 65 delas desenvolveram epilepsia (Carvalho *et al.*, 2020). Resultando em uma incidência de 71,4%. O tipo mais comum identificado nos primeiros 24 meses foi o de espasmos infantis (83,1%) (Carvalho *et al.*, 2020). Nesse mesmo estudo, as crises foram tratadas com diferentes fármacos anticonvulsivantes, como valproato, levetiracetam, benzodiazepínicos, fenobarbital e vigabatrina, porém sem remissão completa dos sintomas (Carvalho *et al.*, 2020). Uma meta análise de 14 estudos corroborou esses dados em coortes maiores (Maia *et al.*, 2021). Estudos como esse não apenas evidenciam a gravidade da condição, como também reforçam a necessidade de políticas públicas e pesquisas que tenham como objetivo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

O acompanhamento dessas crianças demanda suporte contínuo, representando um grande desafio para o sistema de saúde pública, especialmente em regiões com

recursos limitados. Além das consequências neurológicas, a epidemia do ZIKV gerou impactos emocionais e socioeconômicos profundos, afetando diretamente os cuidadores e sobrecarregando os serviços públicos de saúde. Estima-se que, apenas em 2016, o impacto econômico de curto prazo no Brasil tenha sido de aproximadamente US\$ 310 milhões (Qureshi A. I., 2018). Apesar da ampla quantidade de estudos sobre as alterações morfológicas e da desorganização do tecido cerebral, ainda há lacunas quanto à compreensão da conectividade funcional e sináptica dos neurônios. Portanto, compreender como essas conexões neuronais estão sendo impactadas pela exposição ao vírus pode contribuir significativamente para saber quais são os mecanismos que levam ao desenvolvimento da epilepsia, contribuindo, assim, para abordagens terapêuticas mais direcionadas e eficazes.

Nesse contexto, a eletrofisiologia representa uma ferramenta essencial para investigar as redes neurais e identificar possíveis alterações na transmissão sináptica resultantes da infecção pelo ZIKV. Por meio dessa metodologia, é possível registrar a atividade elétrica dos neurônios, permitindo avaliar a integridade e a eficiência das sinapses em diferentes estruturas cerebrais. Para interpretar esses registros, é importante considerar que a atividade elétrica dos neurônios depende de mecanismos básicos de bioeletrogênese, como o potencial de repouso estabelecido pelos gradientes de íons e a despolarização que ocorre durante a comunicação sináptica (Hille, 2001). Uma das estruturas mais estudadas eletrofisiologicamente é o hipocampo, uma região profunda do lobo temporal medial fundamental para a aprendizagem e memória, e reconhecida por sua citoarquitetura organizada, que favorece o estudo da excitabilidade e da plasticidade sináptica (Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., 2000; Shepherd, 2004). O hipocampo, em humanos, é formado pelas regiões CA1, CA2, CA3, CA4 e giro denteado (DG), interconectadas entre si (Shepherd, 2004). Dentre essas regiões, as fibras colaterais de Schaffer correspondem aos axônios dos neurônios piramidais de CA3, que se conectam aos dendritos dos neurônios piramidais de CA1 (Figura 1) (Nicoll, R. A., & Schmitz, D. 2005; Shepherd, 2004).

Figura 1: Representação esquemática do hipocampo de camundongo



(Adaptado de Paxinos; Franklin, 2001; Radahmadi; Halabian; Halabian, 2025. Criado em Biorender.)

Essa via é vulnerável a infecções virais e à epilepsia, sendo um modelo amplamente utilizado para investigar mecanismos patológicos que afetam a transmissão glutamatérgica e a plasticidade sináptica (Shepherd, 2004). No hipocampo, essa comunicação acontece predominantemente pela ação do glutamato sobre receptores excitatórios, como receptores AMPA e NMDA, gerando potenciais excitatórios pós-sinápticos (EPSPs), que podem ser registrados extracelularmente. Esses registros permitem avaliar a integridade e a eficiência das sinapses, além de analisar parâmetros fundamentais como a amplitude, que mostra o recrutamento das fibras, a facilitação de pulso pareado (PPF), que fornece informações sobre plasticidade de curto prazo e probabilidade de liberação pré-sináptica e a inclinação da reta (*slope*), que permite observar a sincronização sináptica (Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., 2000; Nicoll, R. A., & Schmitz, D. 2005; Purves, D., *et al.* 2018; Shepherd, 2004). Portanto, a caracterização eletrofisiológica da via Schaffer-CA1 em modelo experimental de infecção perinatal pelo ZIKV pode fornecer informações importantes sobre os mecanismos de disfunção sináptica associados à doença, uma vez que o modelo animal utilizado consegue mimetizar sinais e sintomas, como a suscetibilidade à epilepsia, também observados em crianças expostas ao ZIKV (Nem de Oliveira Souza *et al.*, 2018). O estudo dessa via permite identificar alterações na amplitude dos EPSPs, na PPF e na eficiência da transmissão

glutamatérgica, contribuindo para compreender como a exposição ao vírus pode levar ao desenvolvimento de epilepsia.

Diante do exposto, o objetivo geral desse trabalho é caracterizar achados eletrofisiológicos de campo em neurônios glutamatérgicos hipocampais de camundongos infectados com ZIKV no período neonatal. Além dos objetivos específicos como a padronização dos processos de obtenção de fatias frescas hipocampais, incluindo soluções de fluido cerebrospinal artificial (aCSF), procedimentos de eutanásia e corte, e manutenção ao longo do tempo. Assim como realizar registros piloto em animais saudáveis para definição de parâmetros para curvas entrada-saída e, por fim, obter curvas entrada-saída em camundongos infectados por ZIKV no período neonatal.

2 METODOLOGIA

2. 1. ACASALAMENTOS, DESMAMES E ANIMAIS

Os animais utilizados foram camundongos *Swiss* de ambos os sexos (CEUA 131/21) submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura entre 21-24°C, umidade de 50-70% e com livre acesso a ração e água filtrada. Esses animais foram mantidos em uma estante micro-isolada (Bonther, Brasil), em caixas com flocos ou maravalha como material de cama, na Unidade de Experimentação Animal (UEA) no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (ICB/UFRJ). Os acasalamentos foram feitos entre camundongos *Swiss* adultos com 2 fêmeas para cada macho, mantidos em uma mesma caixa durante 48 horas. Após esse tempo, as fêmeas foram realocadas em suas caixas-moradia. No 14º dia pós acasalamento, aquelas com peso ≥ 4 g foram consideradas grávidas e individualmente alocadas em caixas com sementes de girassol e pequenos rolos de algodão. Os nascimentos foram checados todos os dias a partir do 18º dia pós acasalamento. A infecção ocorreu no 3º dia pós-natal (P3), a partir da utilização de uma cepa de ZIKV brasileira (GenBank: KX197192.1) e as ninhadas foram normalizadas para que não tivessem mais do que 10 animais cada. Essa exposição neonatal aconteceu por via subcutânea, com volume administrado de 20 μ L, em uma titulação de 10^6 unidades formadoras de placas (UFP). Para o grupo controle foi administrado, pela mesma via e mesmo volume, o meio de cultura do mesmo tipo celular utilizado na replicação do ZIKV, C636, porém esse meio não recebe o vírus e

é chamado de Mock (Nem de Oliveira Souza *et al.*, 2018). Em P25, foram separados quanto ao sexo em grupos de 2-5 filhotes. Todos os animais utilizados foram monitorados diariamente quanto aos níveis de umidade, temperatura, limpeza das caixas, mortes, quantidade de ração e água, visando promover boas condições de saúde, higiene e bem-estar.

2. 2. SOLUÇÕES

Tendo em vista que é de suma importância a viabilidade celular, foram utilizadas duas soluções de fluido cerebrospinal artificial (aCSF) para garantir essa condição (Figueiredo *et al.*, 2019; Ting *et al.*, 2018). A solução de aCSF NMDG-HEPES, padronizada no Laboratório de Farmacologia Molecular pelo Prof. Newton Castro (ICB/UFRJ), e a solução de aCSF padrão contendo a composição descritas nas tabelas 1 e 2 abaixo. As soluções foram previamente feitas e finalizadas nos dias dos experimentos e os reagentes foram diluídos em água destilada deionizada. Para a solução de aCSF NMDG-HEPES, utilizou-se um estoque com prazo de validade de uma semana e no dia foram adicionados os seguintes reagentes: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, piruvato de sódio, N-acetilcisteína e ácido ascórbico, mantendo o volume inicial. Já para o aCSF padrão, foi feito um estoque concentrado 10x com prazo de validade de um mês, diluído no dia com água deionizada e a adição de glicose, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Seus pHs foram corrigidos quando necessário, com NaOH (hidróxido de sódio) ou HCl (ácido clorídrico), para ficarem em 7.55 para a solução de aCSF NMDG-HEPES e 7.4 para a solução de aCSF padrão, com osmolaridade teórica de 300 mOsm/kg.

Tabela 1. Composição da solução aCSF NMDG-HEPES

Componente	Concentração (mM)	Origem	Código	Lote
NMDG	100	Sigma	10239224	-
HEPES	20	Sigma	102123689	SLCB8158
Glicose	25	Vetec	24/25-39	DCBB8443
NaHCO_3	25	Vetec	306	971127
KCl	2,5	Proquímios	-	13/0431
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,25	Reagen	-	060156
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5	Reagen	-	-

HCl	100	Reagen	-	-
MgSO₄.7H₂O	10	Reagen	-	860782
Piruvato de Sódio	3	Gibco	11840030	10116396
N-Acetilcisteína	2	Sigma	1002619608	WXBC5687V
Ácido Ascórbico	0,5	Sigma	A-1417	94HO27

NMDG: N-metil-D-glucamina, HEPES: 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-etano-sulfônico

Tabela 2. Composição da solução de aCSF Padrão

Componente	Concentração (mM)	Origem	Código	Lote
HEPES	5	Sigma	102123689	SLCB8158
NaCl	125	Merck	7647-14-5	K43957204-248
NaHCO₃	25	Vetec	306	971127
KCl	2,5	Proquímios	-	13/0431
NaH₂PO	1,25	Reagen	-	060156
Glicose	15	Vetec	24/25-39	DCBB8443
MgSO₄.7H₂O	1,3	Reagen	-	860782
CaCl₂.2H₂O	2,4	Reagen	-	-

2. 3. OBTENÇÃO DE FATIAS AGUDAS DE HIPOCAMPO

Para a padronização da técnica de obtenção das fatias agudas de hipocampo, foram utilizados animais saudáveis adultos (> P60) anestesiados com isoflurano (BioChimico, Brasil) 50% em propileno glicol. Após, realizou-se uma perfusão transcardíaca com aCSF NMDG-HEPES previamente resfriado a 4 °C e oxigenado em gás oxigênio (O₂). Em seguida, foi feita a decapitação do animal e a retirada do cérebro da caixa craniana, assim como dissecções grosseiras para retirada de estruturas dispensáveis, como o cerebelo e parte do córtex frontal. O tecido foi rapidamente posicionado em uma cuba preenchida com aCSF NMDG-HEPES oxigenado e resfriado a 4 °C, e foram realizados cortes coronais com uma espessura de 350 µm utilizando vibratomo (TPI Vibratome 1000, EUA). Essas fatias tiveram os hemisférios separados e foram levadas para uma câmara de descanso com aCSF NMDG-HEPES oxigenado em gás carbogênio (95% CO₂ 5% O₂) mantida em banho-maria em uma temperatura de 32 °C. A partir disso, em intervalos de 5 minutos, foram

feitas trocas gradativas da solução de aCSF NMDG-HEPES para a solução de aCSF padrão, que também foi mantida em banho-maria na mesma temperatura e oxigenada com gás carbogênio. Essa troca acontece como descrito na tabela 3 abaixo:

Tabela 3. Troca da solução de aCSF NMDG-HEPES para aCSF padrão

Tempo(min)	Trocas	aCSF padrão (%)
0'	Câmara de recuperação com 60 mL de aCSF NMDG-HEPES	0
5'	Acrescentar 15 mL aCSF padrão	20
10'	Acrescentar 10,7 mL aCSF padrão	30
15'	Aspirar 42,7 mL e acrescentar 17,3 mL aCSF padrão	50
20'	Aspirar 30 mL e acrescentar 45 mL aCSF padrão	80
25'	Transferir fatias para béquer de aCSF padrão	100
30'	Tirar do banho-maria	

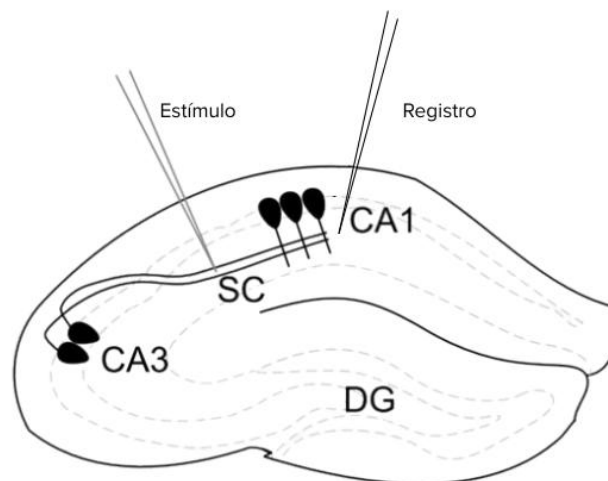
Feita essa troca, as fatias foram transferidas para uma outra câmara de descanso, fora do banho-maria, contendo apenas aCSF padrão mantido em gás carbogênio, onde permaneceram durante uma hora e trinta minutos. Passado esse tempo, elas foram transportadas para uma câmara perfundida com aCSF padrão oxigenado com gás carbogênio, em temperatura ambiente, dentro de um *setup* de eletrofisiologia. Esse *setup* é composto por uma gaiola de Faraday, responsável pela proteção contra interferências elétricas externas, uma mesa pneumática, que auxilia na redução dos ruídos mecânicos e por um estereoscópio (Nikon SMZ-2B, Japan) para visualização do tecido. Fazendo uso de todos esses aparelhos, foi possível realizar registros eletrofisiológicos válidos. Os experimentos foram realizados em até oito horas após a obtenção das fatias.

2. 4. SETUP DE ELETROFISIOLOGIA E ELETRODOS

Os registros foram feitos com o auxílio de dois eletrodos e um estereoscópio para visualização. O primeiro, um eletrodo de estímulo, feito de aço (WPI, EUA), foi posicionado nas fibras colaterais de Schaffer, na região CA3 do hipocampo. Nos dois últimos experimentos, utilizou-se um eletrodo confeccionado no próprio laboratório (*made in-house*). O eletrodo de estímulo fica conectado a uma caixa de estímulo DS3

(Digitimer, EUA), na qual foi possível modular qual será a duração e a intensidade da corrente aplicada. O segundo, um eletrodo de registro, composto por um fio de prata cloretado dentro de uma micropipeta de vidro borossilicato possuindo uma resistência de 2,5 MOhm. Essa, por sua vez, preenchida com uma solução de cloreto de sódio (NaCl) em uma concentração de 2 M. Com o segundo eletrodo devidamente preparado, ele foi posicionado nos dendritos dos neurônios piramidais (*stratum radiatum*) na região CA1. É esse eletrodo que fez a captação dos EPSPs dessa população neuronal, tornando possível o registro, armazenamento e análise desses dados.

Figura 2: Posicionamento dos eletrodos de estímulo e registro na via sináptica Schaffer-CA1



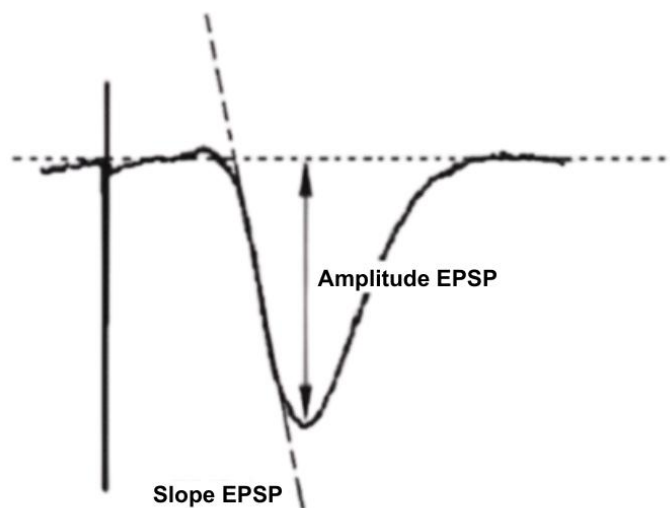
(Adaptado de Onimus *et al.*, 2024)

2. 5. REGISTRO E ANÁLISE DE DADOS

Os registros foram feitos utilizando o *software* WinLTP e a aplicação de dois estímulos com intervalo de 40 ms entre eles. A intensidade utilizada foi de 0,1 mA a 1,5 mA, com uma duração de 100 ms. Esse sinal passou por um *headstage*, um amplificador EXT-02B (npi electronic, Alemanha) e um digitalizador TL-1 interface (Axon Instruments, EUA). Os dados coletados foram posteriormente analisados utilizando o *software* Clampfit 11.4.2 (Axon Instruments, EUA). Para isso, foram posicionados dois cursores em 13 e 5 ms antes da primeira resposta para definição da primeira linha de base, juntamente com outros dois cursores em 53 e 5 ms antes da segunda resposta. Para a análise dos EPSPs, foram posicionados cursores

adicionais, sendo um no início e um no pico de cada uma das respostas obtidas. Com essa análise, foi possível medir qual é a amplitude máxima apresentada pelos EPSPs daquela população neuronal. Além de análises como a facilitação de pulso pareado (PPF), permitindo fazer uma razão entre a amplitude máxima dos dois sinais biológicos, e a inclinação da reta (*slope*) dos EPSPs (Figura 3). Na faixa de estímulos de 0.5-5.0 mA, foram realizadas cinco repetições (*sweeps*) por intensidade, sendo posteriormente calculada a média de cada uma delas. Nos experimentos com intensidades entre 0.1-1.5 mA, foram realizadas dez repetições por estímulo, também sendo realizada a média correspondente.

Figura 3: Representação da região analisada para amplitude e slope dos EPSPs



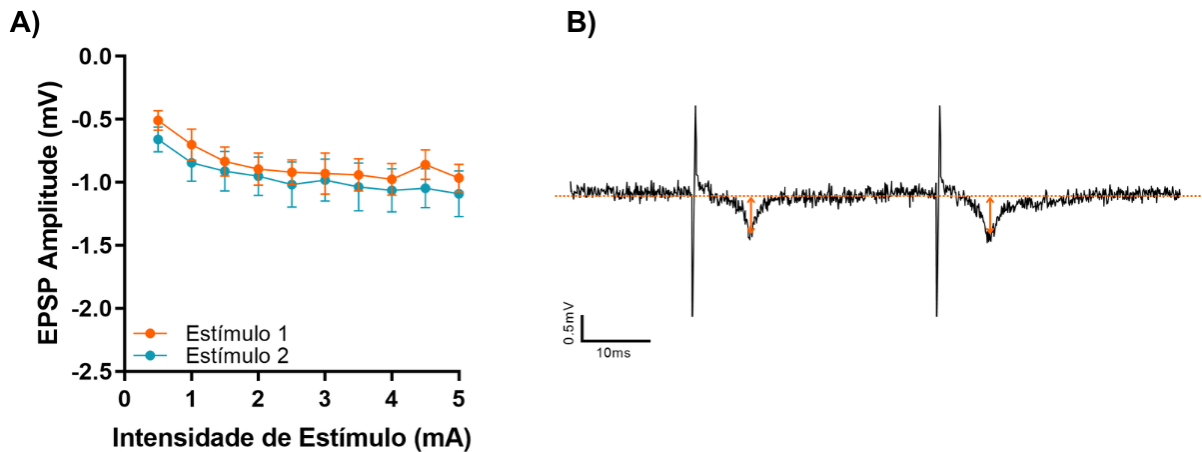
Demonstração da região do cálculo da amplitude e *slope* na fase ascendente do EPSP (Adaptado de Radahmadi; Halabian; Halabian, 2025)

3 RESULTADOS

Para determinar a faixa ideal de estímulo, foram aplicados pulsos elétricos quadrados de diferentes intensidades nas fibras colaterais de Schaffer, com registro dos EPSPs no *stratum radiatum* da região CA1 do hipocampo de animais saudáveis. Inicialmente, utilizou-se uma faixa de estimulação de 0.5-5.0 mA, com incrementos de 0.5 mA. Com isso, notou-se que os EPSPs referentes ao primeiro estímulo apresentavam amplitudes iniciais relativamente elevadas, com média de $-0,510 \pm 0,156$ mV, atingindo um platô nas intensidades de aproximadamente 2 mA (amplitude de $-0,895 \pm 0,257$ mV). Esses resultados indicaram que as sinapses Schaffer-CA1 avaliadas poderiam estar responsivas a estímulos de menores intensidades,

sugerindo que curvas entrada-saída mais completas poderiam ser obtidas, com amplitudes iniciais mais próximas do zero (Figura 4).

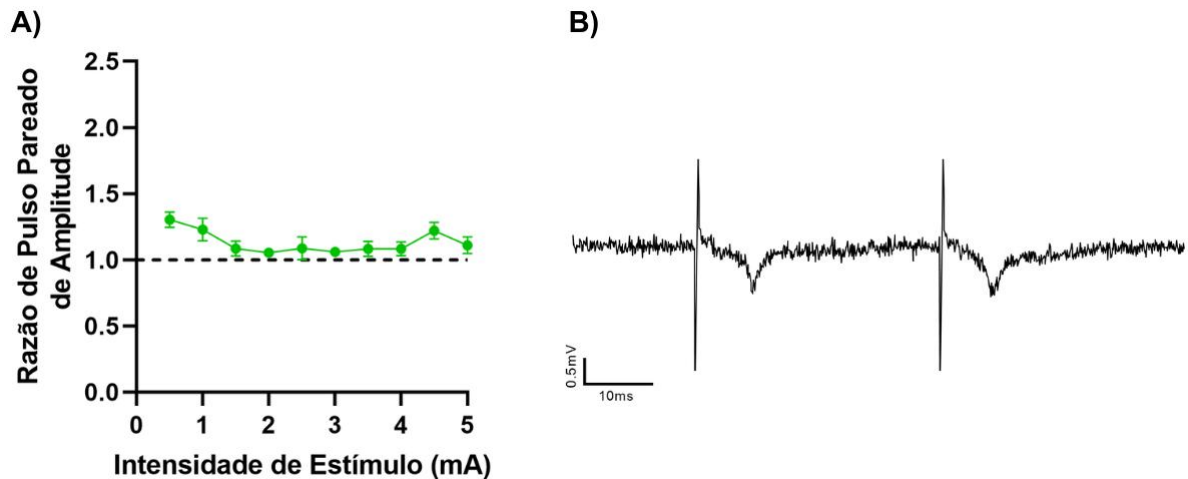
Figura 4: Curva entrada-saída da via Schaffer-CA1 de fatias frescas de hipocampo de camundongos adultos



A) Relação entre a intensidade de estímulo (0.5-5 mA com incrementos de 0.5 mA) e a amplitude dos EPSPs na via sináptica Schaffer-CA1, mostrando aumento discreto da amplitude até atingir um platô. Dados representados como média e erro padrão da média. **B)** Traçado representativo registrados na intensidade de estímulo de 5 mA, ilustrando o local da amplitude do EPSP (setas laranja). n = 4 fatias de 3 animais.

Também foi realizada uma análise quanto a PPF nesses dados, onde observou-se uma facilitação do segundo pulso em relação ao primeiro, visto como uma maior amplitude. Como esperado para sinapses glutamatérgicas funcionais e saudáveis da via colateral de Schaffer-CA1, observou-se uma facilitação discreta, principalmente nas intensidades iniciais, com razão de PPF média de $1,304 \pm 0,120$ no estímulo inicial de 0.5 mA. Com o aumento da intensidade de estímulo, essa razão decresceu, aproximando-se de 1 ($1,085 \pm 0,114$) a partir de 1.5 mA, indicando o aumento do primeiro pulso em relação ao segundo e a saturação sináptica, conforme mostrado na Figura 5.

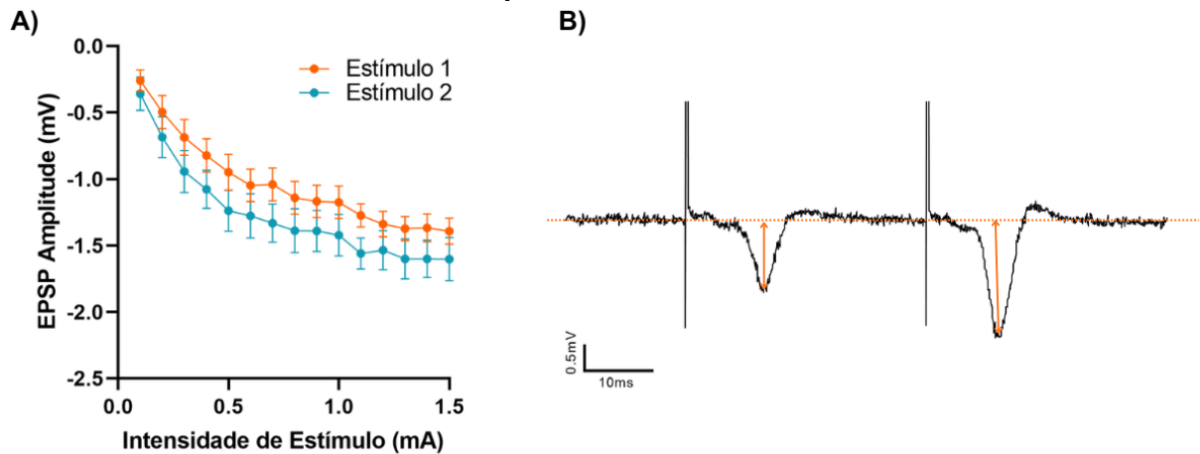
Figura 5: Razão da PPF em diferentes intensidades de estímulo na via sináptica Schaffer-CA1



A) Razão entre as amplitudes do segundo e do primeiro EPSP ($E2/E1$) para intensidades de 0.5-5 mA, com incrementos de 0.5 mA. A linha tracejada indica o valor 1, correspondendo a ausência de facilitação. Dados representados como média e erro padrão da média. **B)** Traçado representativo em 5 mA com intervalo interpulso de 40ms. n = 4 fatias de 3 animais.

Com base na análise dos dados anteriores, novos experimentos foram realizados ainda em animais saudáveis para ajuste das intensidades de estimulação, visando obter curvas entrada-saída mais completas. Uma nova faixa de estímulos foi utilizada, variando de 0.1-1.5 mA, com incrementos menores, de 0.1 mA. Nessa condição, observou-se que a curva entrada-saída apresentou amplitudes iniciais menores no primeiro estímulo, com média de $-0,260 \pm 0,227$, aumentando gradualmente conforme o aumento das intensidades de estimulação. O platô foi atingido em intensidades mais altas, próximo de 1.3 mA de estímulo, com média de resposta de $-1,373 \pm 0,238$, indicando o recrutamento máximo das fibras sinápticas (Figura 6).

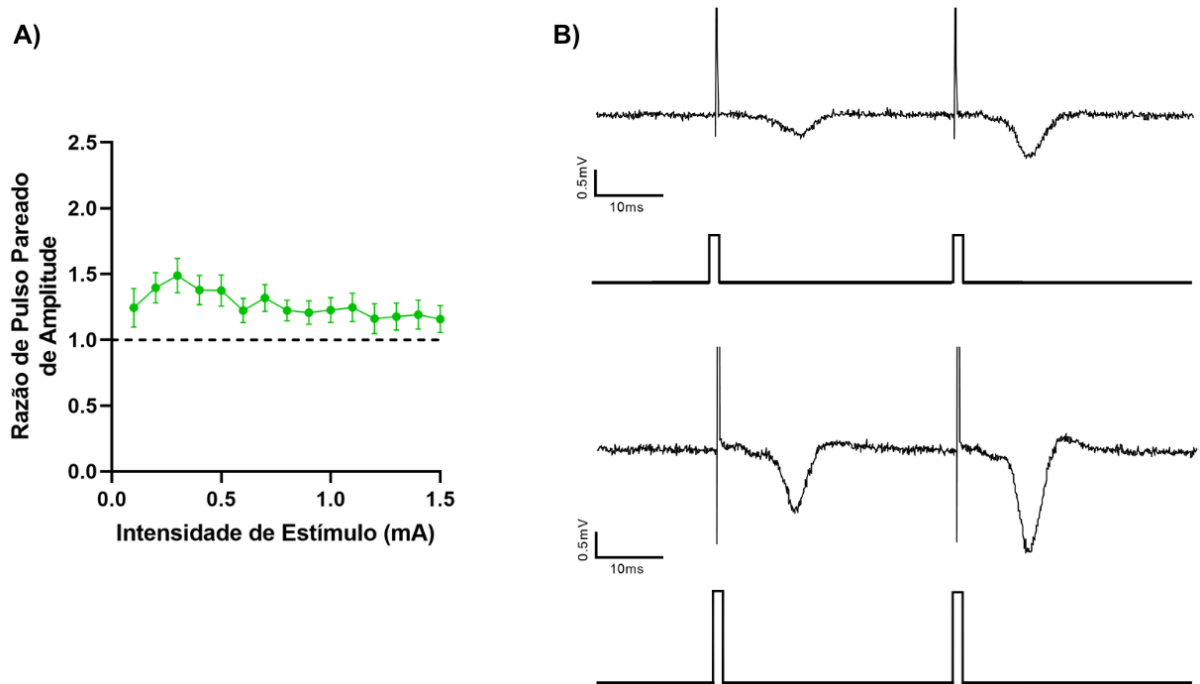
Figura 6: Relação entre a intensidade de estímulo e a amplitude dos EPSPs da via sináptica Schaffer-CA1



A) Curva entrada-saída obtida em intensidade de 0.1-1.5 mA, com incrementos de 0.1 mA, mostrando aumento progressivo da amplitude dos EPSPs até seu platô. Dados representados como média e erro padrão da média. **B)** Traçado representativo com estímulo de 1.5 mA, ilustrando o local da amplitude do EPSP (setas laranja). $n = 8$ fatias de 6 animais.

Com esses dados, também foram realizadas novas análises de PPF, utilizando a faixa de estimulação de 0.1-1.5 mA, com incrementos de 0.1 mA (Figura 7). Nessa análise, observou-se uma maior razão de PPF nas intensidades menores, ficando próximo de 1.5 nas primeiras estimulações ($1,487 \pm 0,370$, no estímulo de 0.3 mA), demonstrando uma facilitação sináptica mais evidente em baixos níveis de recrutamento pré-sináptico. À medida que a intensidade foi gradualmente aumentada, essa razão apresentou uma redução, aproximando-se de 1 e atingindo um platô a partir de 0.8 mA ($1,223 \pm 0,220$), refletindo uma diminuição da probabilidade de facilitação com o aumento da ativação sináptica.

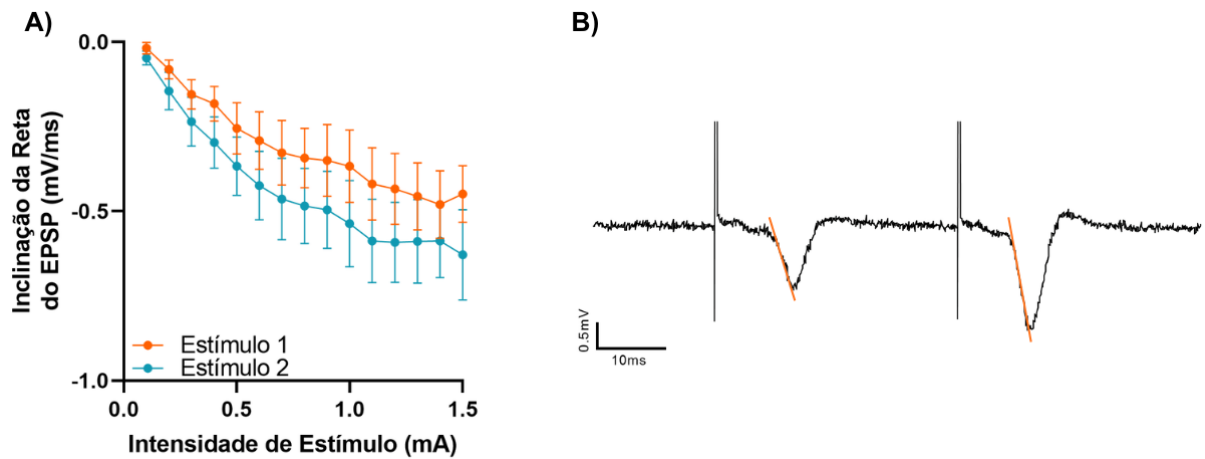
Figura 7: Relação entre a intensidade de estímulo e a razão da PPF da via sináptica Schaffer-CA1



A) Razão de pulso pareado (E_2/E_1) para estímulos de 0.1-1.5 mA, com incrementos de 0.1 mA. A linha tracejada indica o valor de 1, correspondendo a ausência de facilitação. Dados representados como média e erro padrão da média. **B)** Traçados representativos de EPSPs obtidos em 0.4 mA e 1.5 mA, ambos com intervalo interpulso de 40 ms. Abaixo de cada um, traçado representativo dos pulsos quadrados aplicados, maiores conforme o aumento da estimulação. $n = 8$ fatias de 6 animais.

Outra medida importante realizada foi a relação entre a intensidade de estímulo e a inclinação da reta (*slope*) dos EPSPs em fatias de hipocampo, apresentada na Figura 8. Observou-se um aumento progressivo no *slope* conforme o aumento das intensidade de estimulação, atingindo um platô nas intensidades mais elevadas, entre 1.0-1.5 mA ($-0,449 \pm 0,221$ mV/ms em 1.5 mA de estimulação). Esse comportamento indica uma maior sincronização sináptica, na qual o recrutamento simultâneo de múltiplas sinapses resulta em respostas mais rápidas, de maior amplitude, com inclinação da reta mais acentuada até atingir a saturação.

Figura 8: Relação entre a intensidade e a inclinação da reta (slope) dos EPSPs



A) Inclinação da reta dos EPSPs em função da intensidade de estimulação (0.1-1.5 mA com incrementos de 0.1 mA), demonstrando aumento gradativo do *slope* até atingir um platô em intensidades mais elevadas. Dados representados como média e erro padrão da média. **B)** Traçado representativo obtido com estímulo de 1.5 mA, ilustrando o local do *slope* na fase ascendente do EPSP (linhas laranja). n = 8 fatias de 6 animais.

Logo, os experimentos realizados permitiram caracterizar de forma robusta a resposta a estimulação elétrica da via colateral de Schaffer-CA1 em animais saudáveis. Os dados de amplitude, *slope* e razão de PPF mostraram padrões compatíveis com sinapses glutamatérgicas funcionais, confirmando a viabilidade tecidual, preparo das soluções e a confiabilidade do protocolo experimental utilizado. Esses achados estabelecem parâmetros de referência consistentes para a utilização em grupos experimentais expostos ao ZIKV no período neonatal.

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que os registros extracelulares realizados em fatias agudas de hipocampo apresentaram respostas sinápticas consistentes com as descritas na literatura, confirmando a validade da técnica aplicada e a qualidade das fatias obtidas (Creager; Dunwiddie; Lynch, 1980; Leung; Fu, 1994; Papouin; Haydon, 2018; Radahmadi; Halabian; Halabian, 2025; Ting *et al.*, 2018; Wigström; Gustafsson, 1981). As curvas entrada-saída apresentaram amplitudes crescentes dos EPSPs com o aumento da intensidade de estímulo, atingindo um platô nas intensidades mais elevadas, um comportamento típico da via Schaffer-CA1. Essa relação direta entre a intensidade de estímulo e a amplitude e o *slope* dos EPSPs refletem a ativação progressiva de um número maior de fibras e a eficiência sinápticas,

até o ponto de saturação (Radahmadi; Halabian; Halabian, 2025; Wigström; Gustafsson, 1981). Ou seja, em intensidades baixas de estímulo, apenas uma pequena quantidade das fibras é ativada ou elas ativam-se de forma menos sincronizada, resultando em respostas com menor amplitude máxima. À medida que a intensidade aumenta, a eficiência do recrutamento das sinapses é maior, aumentando a amplitude até atingir um platô, quando todas as sinapses disponíveis já foram ativadas. Esse comportamento, observados nos resultados obtidos, são o esperado em sinapses glutamatérgicas funcionais e bem preservadas (Creager; Dunwiddiet; Lynch, 1980; Radahmadi; Halabian; Halabian, 2025; Wigström; Gustafsson, 1981).

Outro ponto avaliado foi a PPF, um fenômeno de plasticidade sináptica que ocorre quando dois estímulos são aplicados em um curto intervalo de tempo. Nesse caso, foi utilizado um intervalo interpulso de 40 ms, o qual, de acordo com estudos, é suficiente para que ocorra um acúmulo de cálcio (Ca^{2+}) no terminal pré-sináptico, principal mecanismo responsável pela facilitação (Creager; Dunwiddiet; Lynch, 1980; Leung; Fu, 1994). Quando o primeiro estímulo chega ao terminal pré-sináptico, ocorre a entrada de íons Ca^{2+} pelos canais de cálcio dependentes de voltagem. Parte desse Ca^{2+} é removido, mas uma fração residual permanece, e ao chegar o segundo estímulo, ocorre um novo influxo de Ca^{2+} potencializando a liberação de vesículas de glutamato, gerando um segundo EPSP de maior amplitude (Glasgow *et al.*, 2019; Südhof, 2012). Isso explica a razão de PPF observada em intensidades mais baixas e sua redução progressiva conforme o estímulo se intensifica. Sinapses com baixa probabilidade de liberação tendem a apresentar maior PPF, justamente pela maior disponibilidade de vesículas após o primeiro estímulo (Creager; Dunwiddiet; Lynch, 1980; Leung; Fu, 1994). Isso está de acordo com os resultados obtidos, onde as intensidades iniciais mostraram maior facilitação, enquanto as mais elevadas indicaram saturação sináptica.

Isso reforça a importância de padronização da técnica e compreensão do funcionamento básico da transmissão sináptica e da plasticidade em animais saudáveis. Tal conhecimento será essencial para futuras investigações sobre como o ZIKV pode alterar a conectividade neuronal e levar ao surgimento da epilepsia. Essa padronização permite distinguir o que é uma resposta fisiológica normal daquela alterada pela infecção ou por interferências durante a preparação do tecido. Dessa forma, a técnica de registro extracelular empregada em fatias de hipocampo

associada à perfusão transcardíaca com aCSF NMDG-HEPES, é válida e eficaz para a caracterização sináptica de neurônios glutamatérgicos da via Schaffer-CA1 em camundongos adultos. As fatias obtidas respondem de acordo com aquelas descritas na literatura, reforçando que o protocolo de obtenção e a viabilidade celular estão adequados e podem ser aplicados em animais expostos ao vírus (Papouin; Haydon, 2018; Ting *et al.*, 2018). A perfusão transcardíaca com aCSF NMDG-HEPES antes da retirada do cérebro é uma etapa essencial para aumentar a viabilidade das fatias e preservar as propriedades elétricas dos neurônios. Essa solução substitui o sódio (Na^+) por NMDG (N-metil-D-glucamina), molécula que mantém a osmolaridade da solução, porém não interage com canais de sódio. Sendo o corte um procedimento traumático para o tecido, levando naturalmente a lise de neurônios e extravasamento de glutamato, a substituição reduz o influxo de íons sódio nos neurônios sobreviventes, minimizando o estresse osmótico e a excitotoxicidade nos mesmos (Tanaka *et al.*, 2008; Ting *et al.*, 2018). Essa técnica, além de proteger a viabilidade neuronal, também aumenta a preservação de interneurônios GABAérgicos, fundamentais para o equilíbrio entre excitação e inibição, o que é particularmente importante em estudos que envolvem modelos de epilepsia (Tanaka *et al.*, 2008; Ting *et al.*, 2018).

A comparação entre os modelos *ex vivo* e *in vivo* é outro ponto importante. No modelo *in vivo*, as redes neuronais permanecem totalmente integradas, o que reflete de maneira mais fidedigna o funcionamento cerebral, porém com menor controle de certas condições experimentais e maior variabilidade nos dados obtidos. Já o modelo *ex vivo*, oferece controle total sobre o ambiente extracelular, temperatura e composição iônica, permitindo estudar os mecanismos de transmissão sináptica e plasticidade (Dulla *et al.*, 2018; Glasgow *et al.*, 2019). Por outro lado, o modelo *ex vivo* apresenta limitações, como a perda de conexões de longa distância, um fator que pode influenciar o comportamento sináptico *in vivo* (Dulla *et al.*, 2018). Apesar de se tratar de um modelo reduzido, as fatias de hipocampo continuam sendo uma importante ferramenta para a investigação da epileptogênese. No contexto da epilepsia de modelo de infecção pelo ZIKV, o uso de preparações *ex vivo* é mais vantajoso, pois permite estudar de forma controlada a excitabilidade sináptica, um mecanismo importante na geração de crises epiléticas. Estudos reforçam que as fatias de hipocampo são relevantes para investigar padrões sinápticos e estados epileptiformes, além de servir como uma ponte entre modelos animais, *in vivo* e *ex*

vivo, e a fisiopatologia humana (Dulla *et al.*, 2018). Portanto, o protocolo utilizado representa uma base sólida para futuras investigações sobre como o ZIKV afeta a conectividade e a excitabilidade neuronal. Tornado possível em estudos futuros a utilização dessa metodologia de obtenção de fatias frescas de hipocampo e podendo contribuir para a investigação de alterações também em *population spikes* (PS) em camundongos expostos ao ZIKV no período neonatal. Tal dado permitiria uma maior compreensão da sincronização anormal que ocorre em estados epiléticos já que a análise dos PS em fatias *ex vivo* podem fornecer uma ligação entre os fenômenos neuronais observados e as manifestações clínicas da epilepsia em fetos que foram expostos ao ZIKV na gestação. Assim sendo, a eletrofisiologia se coloca como um método essencial para que os achados experimentais ajudem na compreensão dos mecanismos epileptogênicos causados pelo vírus.

5 CONCLUSÃO

Com base nas análises realizadas, foi possível confirmar que as soluções de aCSF são adequadas para a obtenção de fatias frescas de hipocampo, garantindo boa viabilidade celular e preservação da citoarquitetura, em concordância com o que é descrito na literatura. Além disso, as fatias apresentaram respostas sinápticas estáveis e compatíveis com os padrões esperados para a via Schaffer–CA1, demonstrando que a faixa de intensidades utilizada nos experimentos foi eficaz para gerar curvas entrada–saída o mais completas possível e representativas do funcionamento sináptico. Esses resultados reforçam a confiabilidade do método e indicam que o protocolo adotado é adequado para estudos posteriores de caracterização eletrofisiológica no modelo murino de infecção pelo ZIKV.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Maria de Fatima Pessoa Militão de *et al.* Epidemia de microcefalia e vírus Zika: a construção do conhecimento em epidemiologia. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 34, n. 10, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2018001003001&lng=pt&tlng=pt.

ARAUJO, Edward *et al.* **Prenatal imaging findings in fetal Zika virus infection**. [S. l.]: Lippincott Williams and Wilkins, 2017.

CARVALHO, Maria Durce C. G. *et al.* Early epilepsy in children with Zika-related microcephaly in a cohort in Recife, Brazil: Characteristics, electroencephalographic findings, and treatment response. **Epilepsia**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 509–518, 2020.

CAUCHEMEZ, Simon *et al.* Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. **The Lancet**, [s. l.], v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616006516>.

CHAN, Jasper F.W. *et al.* **Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease**. [S. l.]: W.B. Saunders Ltd, 2016.

CREAGER, B Y Robert; DUNWIDDIE, Thomas; LYNCH, Gary. Paired-pulse and frequency facilitation in the cai region. **The Physiological Society**, [s. l.], v. 299, p. 409–424, 1980.

DIAS, Ítala Keane Rodrigues *et al.* Zika virus: - a review of the main aspects of this type of arbovirosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 261–269, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29972554>.

DICK, G W A; KITCHEN, S F; HADDOW, A J. **509 ZIKA VIRUS (I). ISOLATIONS AND SEROLOGICAL SPECIFICITY** TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE. [S. l.: s. n.], 1952.

DUFFY, Mark R *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of

Micronesia. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 360, n. 24, p. 2536–43, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516034>.

DULLA, Chris G. *et al.* How do we use in vitro models to understand epileptiform and ictal activity? A report of the TASK1-WG4 group of the ILAE/AES Joint Translational Task Force. **Epilepsia Open**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 460–473, 2018.

FAUCI, Anthony S.; MORENS, David M. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 374, n. 7, p. 601–604, 2016.

FIGUEIREDO, Claudia P. *et al.* Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 3890, 2019.

FISHER, Robert S. *et al.* ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.12550>.

FOY, Brian D. *et al.* Probable Non–Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011. Disponível em: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/5/10-1939_article.htm.

FROTA, Lêda Maria da Costa Pinheiro *et al.* Children with congenital Zika syndrome: symptoms, comorbidities and gross motor development at 24 months of age. **Heliyon**, [s. l.], v. 6, n. 6, 2020.

GLASGOW, Stephen D. *et al.* Approaches and limitations in the investigation of synaptic transmission and plasticity. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, [s. l.], v. 11, n. JUL, p. 1–16, 2019.

HENNESSEY, Morgan; FISCHER, Marc; STAPLES, J Erin. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 55–58, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26820163>.

HILLE, B. (2001). **Ionic channels of excitable membranes (3o ed.)**. Oxford 29

University Press.

KANDEL, E.; JESSELL, T. M. **Principles of Neural Science, Fourth Edition**. [s.l.] McGraw-Hill Medical, 2000.

LEUNG, L. Stan; FU, Xiao Wen. Factors affecting paired-pulse facilitation in hippocampal CA1 neurons in vitro. **Brain Research**, [s. l.], v. 650, n. 1, p. 75–84, 1994.

MAGNUS, Mariana Munari *et al.* Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 250–254, 2018.

MAIA, César Quadros *et al.* Epilepsy in children with Congenital Zika Syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Epilepsia**, [s. l.], v. 62, n. 5, p. 1193–1207, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Uma análise da situação de saúde e da epidemia pelo vírus Zika e por outras doenças transmitidas pelo Aedes aegypti**. Brasília: [s.n.], 2017. Disponível em: . Acesso em: 23/fev./25. ISBN: 978-85-334-2454-8.

MOORE, Cynthia A. *et al.* **Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians**. [S. l.]: American Medical Association, 2017.

MUSSO, Didier *et al.* Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015. Disponível em: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/2/14-1363_article.htm.

MUSSO, Didier; KO, Albert I.; BAUD, David. Zika Virus Infection — After the Pandemic. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 381, n. 15, p. 1444–1457, 2019.

NEM DE OLIVEIRA SOUZA, Isis *et al.* **Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice** *Sci. Transl. Med.* [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <http://stm.sciencemag.org/>. .

NICOLL, R. A.; SCHMITZ, D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 6, n. 11, p. 863–876, nov. 2005.

ONIMUS, Oriane *et al.* The gut-brain vagal axis scales hippocampal memory processes and plasticity. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 199, 2024.

PADILHA, Karine Pedreira *et al.* Zika infection decreases aedes aegypti locomotor activity but does not influence egg production or viability. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 113, n. 10, 2018.

PAHO. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. **Pan American Health Organization**, [s. l.], p. 1–11, 2015.

PAPOUIN, Thomas; HAYDON, Philip. Obtaining Acute Brain Slices. **BIO-PROTOCOL**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2018.

PAXINOS, George; FRANKLIN, Keith B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. [S. l.: s. n.], 2001-. ISSN 09601643.

POSSAS, Cristina. **Zika: what we do and do not know based on the experiences of Brazil**. [S. l.: s. n.], 2016.

QURESHI A. I. Economic Impact of Zika Virus. *In*: ZIKA VIRUS. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 137–142. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128123652000123>.

RADAHMADI, Maryam; HALABIAN, Alireza; HALABIAN, Arshia. An overview of extracellular field potentials: Different potentiation and measurable components, interpretations, and hippocampal synaptic activity models. **Methods**, [s. l.], v. 239, n. December 2024, p. 50–63, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2025.03.015>.

ROTH, Nicole M. *et al.* Notes from the Field: Autism Spectrum Disorder Among Children with Laboratory Evidence of Prenatal Zika Virus Exposure — Puerto Rico, 2023 . **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, [s. l.], v. 72, n. 29, p. 802–804, 2023.

SANTANA, Eduardo Felix Martins *et al.* Intrauterine Zika virus infection : review of the current findings with emphasis in the prenatal and postnatal brain imaging diagnostic methods. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–7, 2021.

SANTI, Lucélia *et al.* Zika Virus Infection Associated with Autism Spectrum Disorder: A Case Report. **NeuroImmunoModulation**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 229–232, 2021.

SHEPHERD, Gordon M. **THE SYNAPTIC ORGANIZATION OF THE BRAIN**. [S. l.: s. n.], 2004.

SÜDHOF, Thomas C. Calcium control of neurotransmitter release. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 4, n. 1, 2012.

TANAKA, Yasuyo *et al.* The effects of cutting solutions on the viability of GABAergic interneurons in cerebral cortical slices of adult mice. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 171, n. 1, p. 118–125, 2008.

TING, Jonathan T. *et al.* Preparation of Acute Brain Slices Using an Optimized N-Methyl-D-glucamine Protective Recovery Method. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], v. 2018, n. 132, p. 1–13, 2018.

VAN DER LINDEN, Hélio *et al.* Epilepsy Profile in Infants with Congenital Zika Virus Infection. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 379, n. 9, p. 891–892, 2018.

WIGSTRÖM, H.; GUSTAFSSON, B. Two types of synaptic facilitation recorded in pyramidal cells of in vitro hippocampal slices from guinea pigs. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 73–78, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epilepsy: a public health imperative. **World Health Organization**, [s. l.], p. 14, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/epilepsy-a-public-health-imperative>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations**. Disponível em: <[https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations](https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations)>.

ZANLUCA, Camila *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in

Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. /], v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.