

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

RAFAEL BORGES ROSA

ADAPTAÇÃO NEURAL E GENITURINÁRIA DA CEPA SELVAGEM DO VÍRUS ZIKA
EM CAMUNDONGOS (*MUS MUSCULUS*)

RECIFE

2019

RAFAEL BORGES ROSA

ADAPTAÇÃO NEURAL E GENITURINÁRIA DA CEPA SELVAGEM DO VÍRUS ZIKA
EM CAMUNDONGOS (*MUS MUSCULUS*)

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde, do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, como requisito para a obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Lindomar José Pena

Coorientador: Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva

RECIFE

2019

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

R788a Rosa, Rafael Borges
Adaptação neural e geniturinária da cepa selvagem
do vírus zika em camundongos (*mus musculus*) / Rafael
Borges Rosa. -- Recife: [s.n.], 2019.
116 p.: il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Biociências e
Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

Orientador: Lindomar José Pena; coorientador:
Marcelo Henrique Santos Paiva.

1. Zika virus. 2. Vacinas. 3. Adaptação. 4.
Imunocompetência. 5. Modelos animais. I. Pena,
Lindomar José. II. Paiva, Marcelo Henrique Santos. III.
Título.

CDU 595.771

RAFAEL BORGES ROSA

ADAPTAÇÃO NEURAL E GENITURINÁRIA DA CEPA SELVAGEM DO VÍRUS ZIKA
EM CAMUNDONGOS (*MUS MUSCULUS*)

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde, do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, como requisito para a obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 30/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Dr. Lindomar José Pena
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Rita de Cássia Carvalho Maia
Centro de Medicina Veterinária/Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho a familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Por tantos anos espero por este momento e agora me faltam palavras para expressar o quanto estou feliz e o quanto sou grato por grandes pessoas que passaram pela minha vida durante essa jornada.

Primeiramente gostaria de agradecer a minha esposa Emilene, que com muito amor e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa final.

Agradeço também aos meus pais Magda e Marçal e a minha irmã Priscila, pelo carinho e incentivo incondicional. Em especial a minha mãe, que foi a responsável por despertar em mim o interesse pela natureza e por todas as formas de vida.

Agradeço ao meu orientador Lindomar José Pena, pelo incentivo, pela confiança e pelas palavras de força que em momentos difíceis me confortaram.

Ao meu Coorientador Marcelo Henrique Santos Paiva por ter compartilhado conhecimentos valiosos que auxiliaram a finalização deste trabalho.

Aos amigos Renata Mendes, Jurandy Magalhães, Bárbara Nayane, Poliana Gomes, Klarissa Miranda, Severino Jefferson, Vanessa Portela, Thiago Soares e Lucas Sousa, pelo carinho, conselhos, incentivos e divertidas risadas nos momentos de descontração.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães pela oportunidade.

À equipe da secretaria acadêmica do curso, por terem sido sempre solícitos e gentis.

*“Em algum lugar, algo incrível está esperando
para ser descoberto.” (Carl Sagan)*

ROSA, Rafael Borges. **Adaptação neural e geniturinária da cepa selvagem do vírus Zika em camundongos (*Mus musculus*)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus que representa um grave problema de saúde pública que atinge principalmente países onde circulam várias espécies de mosquitos vetores, como o Brasil. As estratégias de prevenção e controle da doença causada pelo ZIKV baseiam-se no controle do vetor, uma vez que vacinas e antivirais ainda não são disponíveis. Um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de vacinas é a falta de um modelo animal adequado à infecção capaz de reproduzir os sinais clínicos laboratoriais e respostas imunológicas semelhantes às observadas em humanos. Atualmente, camundongos portadores de deficiência genética na via do IFN têm sido amplamente utilizados em estudos com o ZIKV, uma vez que camundongos com sistema imunológico hígido não sucumbem a doença. No entanto, a principal limitação de tais modelos é que eles não permitem um estudo abrangente da imunidade ao ZIKV devido a uma linha de defesa fraca ou ausente, o que é crítico para a resposta antiviral. Neste trabalho realizamos a neuroadaptação da cepa parental do ZIKV através de passagens seriadas em cérebros de camundongos nocautes. As passagens cerebrais do vírus levaram ao aumento da expressão de sinais da doença nos animais. Manifestações neurológicas foram cada vez mais evidentes como incoordenação motora e estado de estupor. Em um ensaio de placas foi possível verificar a diferença fenotípica da formação de placas do vírus neuroadaptado quando comparado a cepa parental. A neuroadaptação de uma cepa parental do ZIKV tem grande potencial de causar doença em animais imunocompetentes permitindo a realização de testes vacinais eficientes, uma vez que os mesmos testes realizados em camundongos imunodeficientes podem subestimar a eficácia da vacina.

Palavras-chave: Zika. Vacinas. Adaptação. Imunocompetentes. Modelo animal.

ROSA, Rafael Borges. **Neural and genitourinary adaptation of the wild strain of the Zika virus in mice (*Mus musculus*)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus that represents a serious public health problem that affects mainly countries where several species of mosquito vectors circulate, such as Brazil. ZIKV disease prevention and control strategies are based on vector control, since vaccines and antivirals are not yet available. One of the major obstacles to the development of vaccines is the lack of an animal model suitable for infection capable of reproducing laboratory clinical signs and immune responses similar to those observed in humans. Currently, mice with genetic deficiency in the IFN pathway have been widely used in studies with ZIKV, since mice with a healthy immune system do not succumb to the disease. However, the major limitation of such models is that they do not allow a comprehensive study of ZIKV immunity due to a weak or absent line of defense, which is critical for the antiviral response. In this work we performed the neuroadaptation of the parental strain of ZIKV through serial passages in brains of knockout mice. The virus's cerebral passages have led to increased expression of disease signals in animals. Neurological manifestations were increasingly evident as motor incoordination and stupor. In a plaque assay it was possible to verify the phenotypic difference of plaque formation of the neuroadaptent virus when compared to parental strain. Neuroadaptation of a parental strain of ZIKV has great potential to cause disease in immunocompetent animals allowing efficient vaccine trials, since the same tests performed on immunodeficient mice may underestimate the efficacy of the vaccine.

Keywords: Zika. Vaccines. Adaptation. Immunocompetent. Animal model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Histórico epidemiológico do ZIKV.....	25
Figura 2 - Estrutura do genoma do vírus Zika.....	27
Figura 3 - Ciclo de Replicação dos Flavivírus	30
Figura 4 - Ciclos de transmissão do vírus Zika.	31
Figura 5 - Formas de transmissão do ZIKV	32
Figura 6 - Tomografia de um recém-nascido com síndrome congênita do ZIKV.	36
Figura 7 - Características e achados clínicos em neonatos com a síndrome congênita do Zika.	37
Figura 8 - Camundongo da linhagem AG129	41
Figura 9 - Camundongo da linhagem A129	42
Figura 10 - Adaptação viral após passagens seriadas em camundongos.....	50
Figura 11 - Camundongo da linhagem Swiss.....	57
Figura 12 - Camundongo da linhagem A129.	58
Figura 13 - Anestesia intraperitoneal em camundongo Swiss.....	59
Figura 14 - Inoculação intracerebral em camundongos neonatos.	61
Figura 15 - Inoculação intracerebral em camundongos adultos.....	62
Figura 16 - Inoculação intracerebral e intravaginal em camundongo.	64
Figura 17 - Passagens seriadas via intracerebral e intravaginal em camundongos Swiss.....	64
Figura 18 - Processamento dos cérebros infectados pelo ZIKV	65
Figura 19 - Passagens seriadas via intracerebral e intravaginal em camundongos A129.	69
Figura 20 - Células da linhagem Vero.....	73
Figura 21 - Comparação do tamanho corporal de camundongos neonatos da linhagem Swiss experimentalmente infectados com o ZIKV.....	74
Figura 22 - Neonatos Swiss infectados com ZIKV.....	74
Figura 23 - Resultado da análise obtida por RT-LAMP.	75
Figura 24 - Gráfico comparativo entre o peso dos cérebros dos animais infectados durante as passagens seriadas comparados aos grupos controle.....	77
Figura 25 - Avaliação morfológica dos cérebros inoculados com o vírus Zika.....	78
Figura 26 - Camundongo A129 em posição de lordose com pelos eriçados.....	79
Figura 27 - Camundongos A129 com conjuntivite comparados ao controle.	80
Figura 28 - Camundongo A129 com paralisia de membros.....	80
Figura 29 - Movimento de pedalagem.	81

Figura 30 - Edema e congestão passiva em membro posterior de camundongo A129 infectado pelo ZIKV.....	82
Figura 31 - Timpanismo gastrointestinal.....	82
Figura 32 - Bexiga atônica ou arreflexa.	83
Figura 33 - Comparação entre o cérebro e o baço de um camundongo A129 infectado com ZIKV comparado ao controle.	84
Figura 34 - Tamanhos de placas observados no ensaio utilizando a cepa parental do ZIKV comparado ao ensaio utilizando a cepa recuperada na passagem 7 do cérebro de camundongos A129.	85
Figura 35 - Ensaio de placas.....	85
Figura 36 - PCR.....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –Informações dos grupos experimentais e controles utilizados no refinamento da técnica de infecção intracerebral pelo ZIKV.....	59
Quadro 2 -Informações dos grupos experimentais e controle dos camundongos utilizados nas passagens cerebrais e vaginais.....	63
Quadro 3 – Primers utilizados nos ensaios de RT-LAMP	67
Quadro 4 – Informações sobre os animais nocautes utilizados nas passagens seriadas do ZIKV.	68
Quadro 5 - Informações dos grupos experimentais e controle e via de infecção dos camundongos utilizados na caracterização da cepa viral obtida (P10) da adaptação cerebral em camundongos A129.	70
Quadro 6 - Resultados obtidos através da técnica RT-LAMP para a constatação viral entre as passagens cerebrais e vaginais de camundongos.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CMV	Citomegalovírus
CO₂	Dióxido de carbono
DENV	<i>Dengue virus</i>
DENV-2	<i>Dengue virus sorotipo 2</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados - <i>Phosphatedeoxyribonucleotides</i>
EBO-Z	Vírus Ebola do subtipo Zaire
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
h	Horas
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
hpi	Horas pós infecção
hSTAT2	<i>Humansignaltransducer and activator of transcription 2</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IFN	Interferon
IFN-β	Interferon beta
IFN-I	Interferon tipo I - corresponde aos interferons α e β
IFN-II	Interferon tipo II - corresponde ao interferon γ
IFN-III	Interferon tipo III - corresponde aos interferons λ ₁ , λ ₂ e λ ₃
IFN-γ	Interferon gama
IFN-α	Interferon alfa
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LAVITE	Laboratório de virologia e terapia experimental
MEM	Meio essencial mínimo
mg	Miligrama
mg/kg	Miligramas por quilograma
mL	Mililitro

mm	Milímetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i>
P0	Passagem zero
P1	Passagem um
P2	Passagem dois
P3	Passagem três
P4	Passagem quatro
P5	Passagem cinco
P6	Passagem seis
P7	Passagem sete
P8	Passagem oito
P9	Passagem nove
P10	Passagem dez
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Pernambuco
PFU	<i>Plaque forming unit</i>
pH	Potencial de Hidrogênio
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
qRT-PCR	<i>Reverse transcription followed by real-time PCR</i>
RdRp	<i>RNA dependent RNA polymerase</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNA_m	<i>Messenger RNA</i>
RPM	Rotação por minuto
RT	<i>Reverse Transcription</i>
RT-LAMP	<i>Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription followed by PCR</i>
SFB	Soro fetal bovino
SGB	Síndrome de Guillain Barré
SNC	Sistema nervoso central
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>

STAT2	<i>Signal transducer and activator of transcription 2</i>
TCID	<i>Tissuecultureinfectious dose</i>
UFP/mL	Unidade formadora de placa por mililitro
UTRs	<i>Untranslated regions</i>
Vero	Células primárias de rins de macaco verde africano
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>
ZIKV	<i>Zika virus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μl	Microlitros
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	22
2.1 Descoberta do vírus Zika	22
2.2 Epidemiologia	24
2.3 Estrutura e genoma do vírus Zika	26
2.4 Ciclo de replicação.....	29
2.5 Transmissão do vírus Zika	31
2.5.1 <i>Transmissão vetorial.....</i>	32
2.5.2 <i>Transmissão não-vetorial.....</i>	33
2.6 Sinais e sintomas clínicos causados pelo vírus Zika	35
2.6.1 <i>Síndrome Congênita do Zika.....</i>	35
2.6.2 <i>Síndrome Congênita do Zika e Condições Oftalmológicas.....</i>	37
2.6.3 <i>SGB e Outras Complicações Neurológicas.....</i>	38
2.6.4 <i>Complicações Hematológicas</i>	38
2.7 Utilização de camundongos <i>knockout</i> em estudos com o vírus Zika.....	39
2.8 Camundongos selvagens como modelo experimental em estudos com o vírus Zika..	45
2.9 Passagens seriadas de vírus em camundongos.....	49
3 JUSTIFICATIVA	52
4 PERGUNTA CONDUTORA	53
5 HIPÓTESE.....	54
6 OBJETIVO GERAL	55
6.1 Objetivos Específicos.....	55
7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	56
7.1 Modelo animal	56
7.2 Inoculação intracerebral em camundongos adultos e neonatos.....	58
7.3 Células e vírus	62
7.4 Adaptação do vírus Zika em camundongos da linhagem Swiss através de infecção intracerebral e intravaginal.....	63
7.5 RT-LAMP	66
7.6 Adaptação do vírus Zika em camundongos da linhagem A129 através de infecção intracerebral.....	67

7.7 Caracterização das cepas adaptadas em camundongos com sistema imunológico intacto	69
7.8 Anestesia e eutanásia	70
7.9 Considerações éticas	71
7.10 Avaliação histopatológica	71
7.11 Titulação viral.....	71
7.12 Sequenciamento	71
7.13 Análise estatística.....	72
8 RESULTADOS	73
8.1 Camundongos neonatos e jovens adultos da linhagem Swiss podem ser infectados intracerebralmente com o vírus Zika	73
8.2 O vírus Zika pode ser detectado entre passagens intracerebrais e intravaginais seriadas em camundongos Swiss	75
8.3 Camundongos Swiss infectados com o vírus Zika não apresentam diminuição de tamanho e peso do cérebro e não apresentam sinais clínicos da doença	77
8.4 Camundongos A129 inoculados via intracerebral com o ZIKV apresentam sinais clínicos da doença	79
8.5 Passagens seriadas do Zika em cérebros de camundongos alteram o fenótipo do vírus	84
9 DISCUSSÃO	87
10 CONCLUSÃO.....	94
11 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	95
REFERÊNCIAS	96
ANEXO A - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	113
ANEXO B – RESUMO APRESENTADO NO CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO	114
ANEXO C – RESUMO APRESENTADO NO XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA	115
ANEXO D – PARTICIPAÇÃO EM COMISSÃO ORGANIZADORA DE SIMPÓSIO	116

1 INTRODUÇÃO

Os Flavivírus pertencem à família *Flaviviridae* e são os principais causadores de doenças infecciosas no mundo, tendo um grande impacto socioeconômico, devido à morbidade e mortalidade associadas a doenças causadas por estes vírus. Assim como outros vírus da família, o vírus Zika (ZIKV) é envelopado e icosaédrico com um genoma de RNA não segmentado, de cadeia simples e senso positivo (KOK, 2016; KUNO *et al.*, 1998; LINDENBACH *et al.*, 2013; MARANO *et al.*, 2016). O RNA do ZIKV replica-se no citoplasma e durante a tradução codifica uma poliproteína com mais de 3.000 aminoácidos, que é posteriormente clivada em três proteínas estruturais, o capsídeo (C), a precursora de membrana (prM) e o envelope (E), e sete proteínas não-estruturais, que são: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (KUNO *et al.*, 1998; LINDENBACH *et al.*, 2007, 2013).

O ZIKV foi identificado pela primeira vez em macacos Rhesus, na Floresta de Zika, localizada em Uganda no ano de 1947. Alguns anos mais tarde, em 1952 na África Oriental, houve o primeiro relato de infecção pelo ZIKV em seres humanos (DICK *et al.*, 1952; SMITHBURN, 1954). Até recentemente os casos de infecção em seres humanos eram esporádicos e concentrados apenas na África e no Sudeste Asiático, até que no ano de 2007 houve um surto da Febre do Zika na Ilha de Yap, parte dos Estados Federados da Micronésia (DUFFY *et al.*, 2009).

Atualmente, um surto causado pelo ZIKV com grande disseminação mundial, esteve presente em mais de 70 países, principalmente naqueles que formam as Américas Central e do Sul (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017). O Brasil foi o primeiro país entre as Américas Central e do Sul onde o vírus foi detectado, sendo o primeiro caso de transmissão autóctone relatado no estado do Rio Grande do Norte em março de 2015. Logo depois, o país apresentou um surto epidêmico, com uma estimativa de 1.300.000 casos suspeitos (BOGOCH *et al.*, 2016; HENNESSEY *et al.*, 2016; ZANLUCA *et al.*, 2015).

Até o ano de 2017 o Brasil apresentou 233.801 casos prováveis de infecção pelo ZIKV, sendo a região Centro-Oeste e Norte do país a com maior taxa de incidência. A região Nordeste notificou 75.733 casos, com o estado da Bahia contribuindo com mais de 50.000 destes. O estado de Pernambuco apresentou apenas uma notificação de 17 casos no ano de 2017 e 24 casos até o mês de junho do ano de 2018 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018).

A transmissão do ZIKV ocorre pela picada do mosquito *Aedes aegypti*, mas alguns estudos indicam que as transmissões vertical e sexual também ocorram (ATKINSON *et al.*,

2016; BESNARD *et al.*, 2014; MARCHETTE *et al.*, 1969; MLAKAR *et al.*, 2016). Quando mediada pelo mosquito, a fêmea do *Aedes* ao realizar hematofagia, injeta o vírus na pele humana, seguida pela infecção de células permissivas (BRIANT *et al.*, 2014).

O tempo de incubação da doença pode variar de 3 a 12 dias, desenvolvendo na fase aguda sintomas característicos como febre variável, rash cutâneo, artralgia, dor de cabeça, dor retro-orbital e conjuntivite (menos frequentemente), apesar destes sintomas, 80% dos infectados permanecem assintomáticos (HEANG *et al.*, 2012). Além destes sinais e sintomas, alguns quadros mais graves têm sido associados à infecção pelo ZIKV, como a Síndrome Congênita do Zika em fetos e a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) em adultos (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2015; OEHLER *et al.*, 2014).

As células da derme e da epiderme que formam a primeira linha de defesa da imunidade inata, parecem ser também as primeiras células a serem infectadas pelo ZIKV. Isto provavelmente ocorre devido a expressão de receptores na superfície celular, os quais servem de porta de entrada para o vírus nas mesmas (HAMEL *et al.*, 2015). Fibroblastos e queratinócitos expressam um ou mais receptores da família DC-SIGN e TAM (AXL ou Tyro3), e apresentam altos títulos de cópias do RNAm viral e de expressão das proteínas do envelope viral, comprovando assim a importância destes receptores. (HAMEL *et al.*, 2015). Além disso, células dendríticas imaturas (*in vitro*) também infectadas com o ZIKV, expressaram proteínas do envelope viral, indicando que ambas são permissivas para a infecção com este vírus (HAMEL *et al.*, 2015).

Assim como outras arboviroses o ZIKV usa a via autofágica para promover sua replicação e disseminação celular através de múltiplos mecanismos (LEE *et al.*, 2008; PANYASRIVANIT *et al.*, 2009). Estas hipóteses são reforçadas pelo estudo de Hamel *et al.* (2015) que através de seus achados, (como por exemplo: a co-expressão da proteína do envelope viral e da cadeia leve 3 (LC3) associada ao microtúbulo citosólico, um marcador específico para autofagossomas), sugere que os vacúolos autofágicos sejam o sítio de replicação viral.

Em estudo realizado por Tappe *et al.* (2015), foi visto uma ativação imune polifuncional na fase aguda da infecção pelo ZIKV, a qual foi refletida pela elevação dos perfis de citocinas associado a resposta de células Th1, Th2, Th17 e também Th9. Segundo este mesmo estudo, o interferon- γ (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), não mostraram aumentos significativos na fase aguda e nem na fase convalescente (TAPPE *et al.*, 2015).

Uma vez infectado pelo ZIKV o sistema imunológico estabelece uma imunidade contra uma possível reinfecção, visto que há apenas um sorotipo do vírus e não existe até hoje, caso

de infecção secundária notificada. Porém, recentes estudos mostram que o ZIKV é capaz de suprimir a resposta imune antiviral devido a interação de algumas de suas proteínas não estruturais com proteínas das vias de sinalização e de indução do IFN-I (IFN- α/β), principais vias no estabelecimento do estado antiviral, porém, o mesmo não atua a nível de IFN-II. Além disto, o ZIKV é capaz de infectar e se replicar em células progenitoras neuronais levando a uma desregulação do ciclo celular por ativação de Caspase 3 (Casp3) o que induz a morte das mesmas (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014; DUFFY *et al.*, 2009; KUMAR, A. *et al.*, 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016; TANG *et al.*, 2016).

As estratégias de prevenção e controle da doença causada pelo ZIKV assemelham-se ao que é realizado em casos com o vírus da dengue (DENV) e baseiam-se no controle do vetor, uma vez que vacinas e antivirais ainda não são disponíveis (HAYES, 2009). Um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de vacinas é a falta de um modelo animal adequado à infecção capaz de reproduzir os sinais clínicos laboratoriais e respostas imunológicas semelhantes às observadas em humanos (AN *et al.*, 1999; BENTE; RICO-HESSE, 2005; COSTA *et al.*, 2012). Atualmente há um esforço crescente para o desenvolvimento de uma série de modelos animais, que suportam a replicação do ZIKV (NAZERAI *et al.*, 2019).

Sendo os animais de laboratório mais comumente usados, os camundongos foram os primeiros a serem explorados para modelar a infecção pelo ZIKV. O primeiro desafio foi possibilitar a replicação viral em camundongos adultos imunocompetentes, os quais, não apresentam sintomas clínicos da doença viral. Portanto, camundongos adultos imunocomprometidos portadores de deficiência genética na via do IFN (Ifnar1, Ifngr1, Stat2, Irf3 / Irf5, Irf3 / Irf5 / Irf7) e camundongos neonatos conhecidos por suas limitadas respostas IFN tipo I têm sido os modelos extensivamente aplicados em estudos com o ZIKV (ALIOTA *et al.*, 2016; YOCKEY *et al.*, 2016). Esses modelos são considerados ferramentas valiosas para delinear o ciclo infeccioso do ZIKV, tropismo celular e transmissão, bem como na avaliação de candidatos a vacinas e medicamentos. Outros modelos de camundongos também foram estabelecidos. Estes possuem as respostas imunes inatas presentes, mas são temporariamente suprimidas pela administração de anti-IFNAR antes da exposição ao ZIKV (GOVERO *et al.*, 2016; MINER *et al.*, 2016) ou contornadas por uma via alternativa de administração de vírus (NAZERAI *et al.*, 2018). Camundongos transgênicos onde o STAT2 foi trocado por STAT2 humano para permitir a suscetibilidade ao ZIKV e um modelo de camundongo humanizado BLT com um sistema imune humano transplantado para permitir a avaliação de respostas imunes humanas, também têm sido sugeridos como modelos para estudos com o ZIKV (SCHMITT *et al.*, 2018).

No entanto, a principal limitação de tais modelos é que eles não permitem um estudo abrangente da imunidade ao ZIKV devido a uma linha de defesa fraca ou ausente, o que é crítico para a resposta antiviral. O desenvolvimento de modelos animais imunocompetentes pode favorecer no avanço das pesquisas realizadas com o ZIKV. Camundongos com sistema imune intacto, por exemplo, permitirão a realização de testes vacinais eficientes, uma vez que os mesmos testes realizados em camundongos imunodeficientes podem subestimar a eficácia da vacina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

O presente tópico apresenta os aspectos teóricos dos temas abordados no decorrer do trabalho; o histórico, características moleculares do ZIKV, epidemiologia, transmissão, doenças e modelos de camundongos utilizados em estudos com o ZIKV.

2.1 Descoberta do vírus Zika

O ZIKV recebeu esse nome, devido ao local onde foi identificado pela primeira vez, em 1947, em um macaco Rhesus localizado na Floresta de Zika, em Uganda. O soro deste animal foi inoculado via intracerebral e via intraperitoneal em 5 camundongos Swiss de 6 semanas de idade. Apenas os camundongos inoculados intracerebralmente ficaram doentes, então a primeira cepa do ZIKV (MR766) foi subsequentemente isolada das suspensões cerebrais destes animais (DIAGNE, 2015; DICK, 1952 e 1953; ZAMMARCHI, 2015).

Em janeiro de 1948, o vírus foi isolado em um pool de mosquitos *Aedes africanus*. A proximidade dos isolamentos, junto com as condições em que o vírus foi isolado – ambos os experimentos aplicados para estudos do vírus da Febre Amarela (YFV), porém independentes e utilizando diferentes metodologias – despertou o interesse dos pesquisadores pelo vírus em questão (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Ainda segundo Dick; Kitchen; Haddow. (1952), os resultados sorológicos, as propriedades e a patogenicidade do vírus, contribuíram para revelar um vírus, o qual jamais tinha sido identificado antes. Em humanos, o vírus só foi isolado pela primeira vez na Nigéria em 1968 (DIAGNE, 2015; ZAMMARCHI, 2015).

Atualmente, sabe-se que o Zika é um vírus que pertence à família Flaviviridae, a qual subdivide-se em quatro gêneros: *Pestivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Flavivirus*. O gênero Flavivirus compreende mais de 80 espécies, sendo algumas delas de grande impacto para a saúde pública humana, e causando perdas socioeconômicas, como por exemplo: DENV, YFV e mais recentemente, o ZIKV (LINDENBACH *et al.*, 2013; MOTA *et al.*, 2016; VASILAKIS; WEAVER, 2017).

Análises filogenéticas permitiram identificar três linhagens principais do ZIKV, baseadas na homologia dos genes codificadores da proteína do envelope (E) envolvida na ligação e fusão do vírus com a membrana da célula alvo, e da proteína NS5, essencial para a replicação e transcrição do RNA viral. De tal modo, as cepas africanas apresentam maior incompatibilidade entre si, o que tornou possível a divisão destas, em duas linhagens, a primeira delas é a linhagem MR766 da qual fazem parte, entre outras cepas, aquelas encontradas na

Costa do Marfim e no Senegal; a segunda delas, é a linhagem nigeriana que compreende as cepas encontradas na República Africana Central e na Nigéria, entre outras. Além destas, existe a linhagem asiática, que engloba as cepas isoladas no Camboja - 2010, na Ilha de Yap - 2007, na Polinésia Francesa - 2013 e no Brasil - 2015, mostrando uma expansão da linhagem asiática do ZIKV (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; FAYE *et al.*, 2014; HADDOW *et al.*, 2012). Ao que indica, todas essas linhagens emergiram em Uganda, porém, foram introduzidas em diferentes regiões dos Continentes Africano e Asiático de forma independente (FAYE *et al.*, 2014).

Inicialmente considerou-se a entrada do ZIKV no Brasil durante a Copa do Mundo de Futebol, em 2014, ou um pouco mais tardiamente, em janeiro de 2015 durante a corrida de canoas do Va'a World Sprint Championship devido à presença marcante no evento de atletas residentes de regiões endêmicas para o ZIKV (MUSSO, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015). Ao contrário do que se pensava, estudos recentes indicaram que o vírus chegou ao Brasil no final de 2013, vindo da América Central e do Caribe, especificamente do Haiti. Imigrantes ilegais vindos do Haiti e militares brasileiros em missão de paz naquele país podem ter trazido o ZIKV para o Brasil. Concluiu-se que o Zika seguiu a mesma rota do genótipo asiático dos vírus chikungunya e dengue que foi da Ásia para a Oceania até chegar à América do Sul (CAMPOS, T. D., *et al.*, 2018).

De acordo com Zanluca *et al.* (2015) a primeira vez que o ZIKV foi detectado no Brasil foi em março de 2015, na cidade de Natal, capital do Rio Grande do Norte, localizado na região nordeste do país. Logo após, o vírus foi detectado na Bahia (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015) e foi se disseminando amplamente por mais de 22 estados até fevereiro de 2016 (HEUKELBACH *et al.*, 2016).

Além da infecção causada pelo ZIKV, foi observado um aumento dos casos de microcefalia no nordeste do Brasil, principalmente nos estados onde a incidência de infecção por este vírus era maior, logo, passaram a desconfiar que o ZIKV estaria diretamente relacionado com as causas de microcefalia. A confirmação veio através da detecção do RNA do vírus em espécimes biológicos de duas mães, após amniocentese e ensaio de qRT-PCR, que tinham fetos com microcefalia diagnosticada por ultrassom (HEUKELBACH *et al.*, 2016; OLIVEIRA, M. *et al.*, 2016). Diante disto, a microcefalia associada ao ZIKV, foi considerada um problema de saúde pública de conceito internacional pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (HEYMANN *et al.*, 2016).

Durante os recentes surtos, Polinésia Francesa -2013 e Brasil – 2015/2016, também foram observados, uma série de casos de Síndrome de Guillain Barré (SGB). Cao-Lormeau e

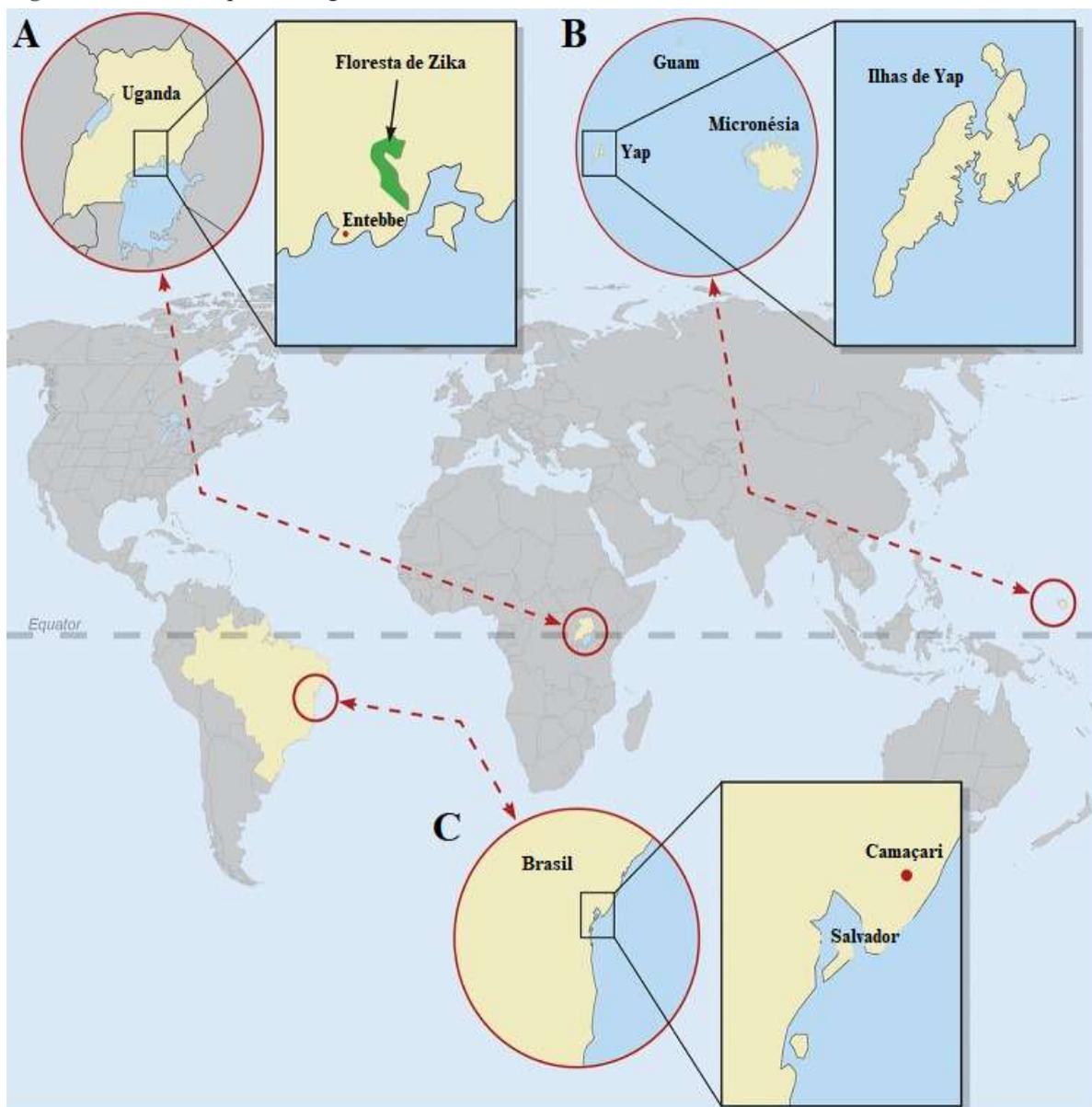
colaboradores em seu estudo de 2014, realizado na Polinésia Francesa, entre outubro de 2013 a março de 2014, observou que 41 de 42 pacientes diagnosticados com SGB tinham anticorpos IgM ou IgG contra o ZIKV. No Brasil, somente o estado da Bahia notificou 76 casos em um mês, destes, 42 foram confirmados e 26 deles tiveram história prévia de infecção por ZIKV ou DENV. Além disso, outros países como Colômbia, El Salvador, Suriname e Venezuela também já associaram a SGB a infecção pelo ZIKV (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016).

2.2 Epidemiologia

As primeiras evidências sorológicas que o ZIKV era capaz de infectar o homem, são apresentadas desde 1952, quando foi detectada a presença de anticorpos neutralizantes no soro de indígenas residentes de Uganda e de Tanganica, na época, de acordo com os números obtidos, o ZIKV já podia ser considerado frequente naqueles países (SMITHBURN, 1954). Porém, a primeira confirmação da infecção humana ocasionada pelo ZIKV, ocorreu no ano de 1964, (SIMPSON, 1964),

Em um intervalo de 7 anos, a literatura médica somente relatou 14 casos humanos de infecção pelo ZIKV (IMPERATO, 2016). Três destes foram detectados na Nigéria em 1968 pelo The Virus Research Laboratory (MOORE *et al.*, 1975), dois casos foram relacionados a infecção laboratorial (BERGE, 1975; FILIPE *et al.*, 1973), e sete casos relatados na Indonésia, no estudo de Olsoni *et al.* (1981). Em estudo realizado por Fagbami. (1979), mais dois casos confirmados através da detecção do RNA viral em pacientes com sintomas característicos da infecção. Ainda neste estudo, de 300 pacientes, 40% deles estavam imunes ao ZIKV, concluindo que apesar do baixo número de isolamento viral, havia uma taxa de disseminação muito maior do vírus do que se imaginava naquela região (FAGBAMI, 1979).

Por volta de 60 anos após a sua descoberta, dois grandes surtos foram relatados, ambos em países sem histórico prévio de infecção (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014; DUFFY *et al.*, 2009). O primeiro deles ocorreu na Ilha de Yap, que compõe o arquipélago dos Estados Federados da Micronésia, no ano de 2007, atingindo 73% dos seus residentes (DUFFY *et al.*, 2009). O segundo grande momento do ZIKV ocorreu na Polinésia Francesa, em 2013 atingindo 11% de uma população com 270.000 habitantes (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014). A partir daí o ZIKV expandiu-se para outras ilhas do pacífico, como: Nova Caledônia, Ilha de Cook, Ilha de Easter, Ilha de Salomão e Ilha de Vanuatu – e, mais recentemente para o Brasil (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; CAO-LORMEAU *et al.*, 2014; MUSSO; CAO-LORMEAU; GUBLER, 2015) (Figura 1).

Figura 1 - Histórico epidemiológico do ZIKV.

Fonte: Waggoner *et al.* (2016, tradução nossa).

Legenda: O ZIKV foi descoberto inicialmente em 1947 na floresta Zika na Uganda (A). Desde o seu isolamento em 1947, foram descritos poucos casos em seres humanos até 2007, quando uma epidemia de ZIKV ocorreu na ilha de Yap, território dos Estados Federados da Micronésia (B). Em 2015, foi reportado o primeiro caso de infecção pelo vírus Zika no município de Camaçari, no estado da Bahia, Brasil (C).

De acordo com o Boletim Epidemiológico, volume 49, divulgado pela Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde) em novembro de 2018, o Brasil havia apresentado 211.770 casos prováveis de infecção pelo ZIKV, dos quais, quase 60% deles foram confirmados. A região do país com maior taxa de incidência foi a região Centro-Oeste, onde estimou-se uma média de 205,3 casos a cada 100 mil habitantes. A região Nordeste notificou 75.733 casos, com o estado da Bahia contribuindo com mais de 50.000 destes. Pernambuco

apresentou apenas uma notificação de 381 casos (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018).

O ZIKV mostrou uma ampla capacidade de disseminação e de infecção em humanos, não somente no Brasil, mas em todo o mundo, principalmente nos países que compõem as Américas Central e do Sul, como Colômbia com 16.419 casos relatados, México com transmissão local confirmada e El Salvador com 240 casos relatados (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017). De 2015 até 12 de janeiro de 2017, 71 países e territórios em todo o mundo relataram evidências da infecção local por ZIKV, entre eles, EUA com 256 casos somente no estado da Flórida. Quanto a infecção relacionada a viagens, 13 países já apresentaram relatos da infecção de pessoa para pessoa até 4 de janeiro de 2017 (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017).

Quanto a Síndrome Congênita do Zika e outras malformações do sistema nervoso central (SNC), mais de 29 países já relataram casos possivelmente relacionado à infecção pelo ZIKV. O Brasil lidera o ranking com 5.280 casos suspeitos de microcefalia sendo o estado de Pernambuco com o maior número de casos relatados, chegando a marca de 646 casos até novembro de 2015 contra uma média anual de 163 novos casos no período entre 2010 a 2014 em todo o território brasileiro (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017; HEUKELBACH *et al.*, 2016; OLIVEIRA, M. *et al.*, 2016).

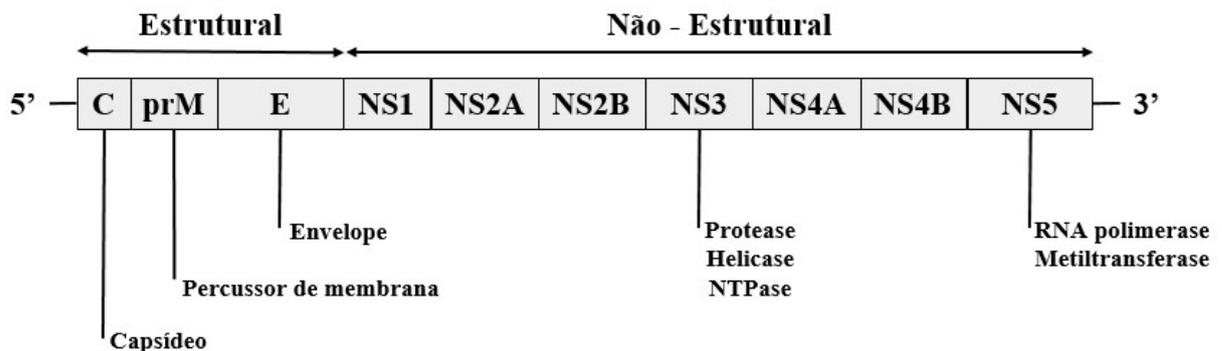
Atualmente, 21 países já relataram possíveis casos de SGB associados à infecção por ZIKV (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017). Somente em El Salvador e na Colômbia foram registrados 46 e 86 casos, respectivamente em um período médio de 5 semanas (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2016). Ainda de acordo com a OMS, entre janeiro e novembro de 2015, o Brasil relatou 1.708 casos de SGB, representando um aumento de 19% na prevalência, sendo os estados de Alagoas, Bahia e Rio Grande do Norte aqueles com maior aumento no número de casos.

2.3 Estrutura e genoma do vírus Zika

O ZIKV possui um nucleocapsídeo de formato icosaédrico, formado por múltiplas cópias da proteína do capsídeo (C) associado a uma molécula de RNA de cadeia simples, não segmentado e polaridade positiva (5'-3'), é circundado por um envelope lipídico proveniente da membrana plasmática da célula hospedeira e de proteínas virais. O vírion tem forma esférica, com um tamanho médio de 50 nm de diâmetro (BARRETO-VIEIRA *et al.*, 2016; LINDENBACH *et al.*, 2013).

O genoma do ZIKV tem aproximadamente 11kb e duas regiões não codificantes (*untranslated regions* - UTRs), em cada uma das suas extremidades. Além disto, possui uma única e extensa fase de leitura aberta (ORF) que codifica a poliproteína viral com 3.423 aminoácidos, a qual é posteriormente processada em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais, que juntas, são responsáveis pelos processos de replicação, transcrição, tradução, montagem e liberação de novos vírions (CHAMBERS *et al.*, 1990; KUNO; CHANG, 2007; MARANO *et al.*, 2016) (Figura 2). As três proteínas estruturais são: proteína do capsídeo (C, 105 aminoácidos), proteína precursora de membrana (prM, 187 aminoácidos) e do envelope (E, 505 aminoácidos). Já as sete proteínas não estruturais (NS) codificadas são: NS1 (352 aminoácidos), NS2A (217 aminoácidos), NS2B (139 aminoácidos), NS3 (619 aminoácidos), NS4A (127 aminoácidos), NS4B (255 aminoácidos), e NS5 (904 aminoácidos) (BARONTI, 2014; DIAGNE, 2015).

Figura 2 - Estrutura do genoma do vírus Zika.



Fonte: Jayasree. (2015, tradução nossa).

Legenda: O ZIKV possui uma única e extensa fase de leitura aberta (ORF) que codifica uma poliproteína viral, a qual é posteriormente processada em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais, que juntas, são responsáveis pelos processos de replicação, transcrição, tradução, montagem e liberação de novos vírions.

As proteínas estruturais participam da via morfogênica no ciclo de replicação. A proteína do capsídeo (C) é responsável por formar o capsídeo no RNA viral, a proteína pré-membrana (prM) é transformada em proteína de membrana (M) atuando como um precursor e por último a proteína do envelope (E), exibe uma estrutura característica de espinha de peixe no vírion, e é tida como o principal sítio antigênico, além de reconhecer receptores celulares específicos, necessários à entrada do vírus na célula (DAI *et al.*, 2016; KUHN *et al.*, 2002; LINDENBACH *et al.*, 2013; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005; PIERSON; DIAMOND, 2012).

As proteínas não-estruturais são essenciais para o processamento das proteínas estruturais e para a síntese de RNA que vão compor o genoma dos novos vírions, e apesar de algumas delas terem função pouco conhecida, outras têm funções bem estabelecidas. (LINDENBACH; RICE, 2003); A proteína NS1 possui duas fases de atuação específicas, a primeira delas, ocorre pela participação no complexo de replicação, e mais tardiamente, é secretada promovendo desta forma a evasão do sistema imune, além de participar do processo de maturação da partícula viral junto com as proteínas estruturais prM e E (AKEY *et al.*, 2014; COX; STANTON; SCHINAZI, 2016; MULLER, D. A. *et al.*, 2013; SCATURRO *et al.*, 2015).

NS2A está envolvida nos processos de replicação e de modulação da resposta imune antiviral (XIE *et al.*, 2013). A NS2B associa-se a subunidade C-terminal da proteína NS3, para que esta desenvolva sua função de protease. Já a porção C-terminal de NS3 desempenha a atividade de helicase (LUO *et al.*, 2015). As proteínas NS4A e NS4B também compõem o complexo de replicação e promovem a evasão do sistema imunológico, além de interagirem com proteínas do hospedeiro (ZMURKO *et al.*, 2015; ZOU *et al.*, 2015).

Altamente conservada, a proteína NS5 é a maior proteína com 903 resíduos e apresenta duas subunidades que desempenham funções essenciais para a replicação do RNA viral. A subunidade C-terminal tem atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), e com isso, faz a síntese de novo, a outra subunidade tem função de capeamento 5'. Análises recentes da sequência desta proteína mostram alterações na sequência do gene NS5, algumas delas presentes na porção C-terminal das cepas isoladas na Colômbia, Martinique, México e Panamá (ADIGA, 2016; LIM; NOBLE; SHI, 2015).

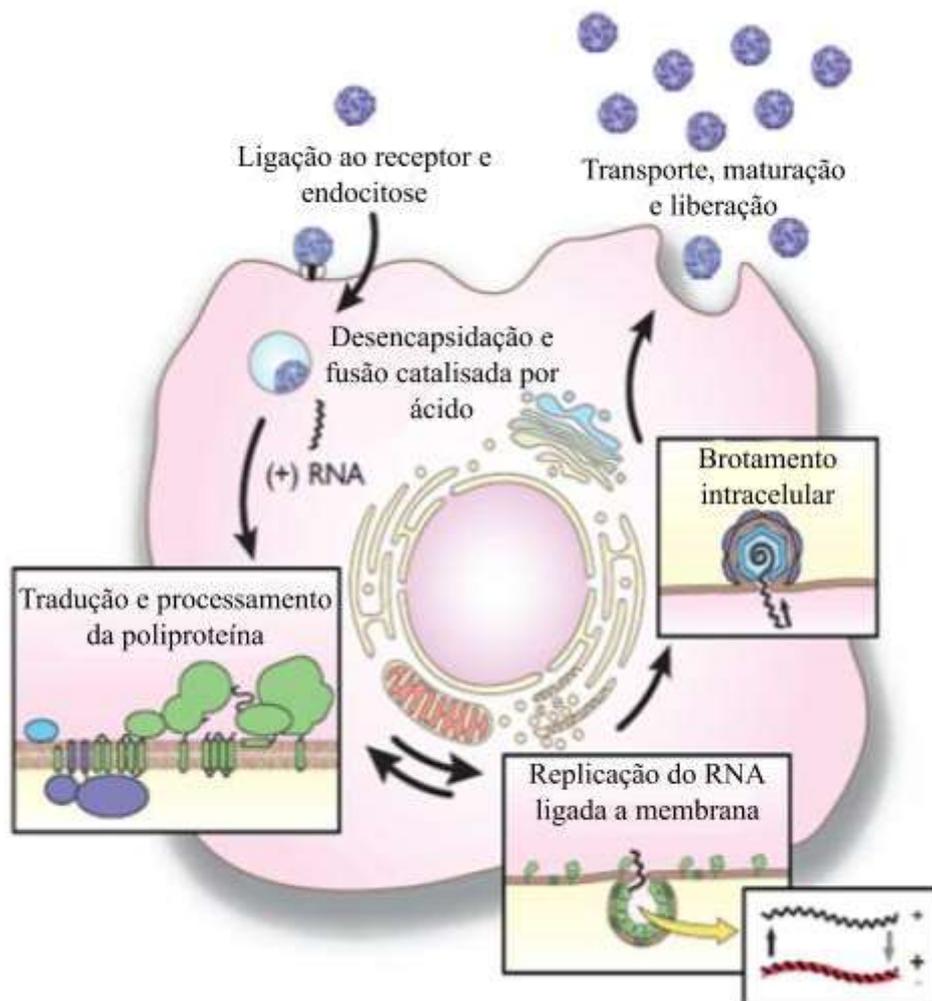
Sirohi *et al.* (2016), avaliou a estrutura do ZIKV maduro e ao comparar com o DENV e com o vírus West Nile (WNV), observou que ambos possuem estruturas similares (KUHN *et al.*, 2002; LINDENBACH *et al.*, 2013; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2013). Porém quanto aos sítios de glicosilação, o ZIKV apresenta apenas um, enquanto são encontrados dois na proteína E do DENV-2 (SIROHI *et al.*, 2016), porém este único sítio de glicosilação pode estar associado a entrada do vírus na célula. Tais partículas, são compostas por 90 heterodímeros E-M, estando ausente a porção pr da proteína prM, diferentemente da partícula viral imatura, que é formada por 60 spikes triméricos das proteínas prM-E, e estão localizados no retículo endoplasmático (RE) da célula infectada, mostrando que o mesmo sofre transformações no processo de transição de partícula viral imatura a madura (KUHN *et al.*, 2002; PRASAD *et al.*, 2017; YU, I.M. *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2003 e 2013).

2.4 Ciclo de replicação

O ZIKV se replica no citoplasma, inicialmente em células dendríticas, perto do local de inoculação e, em seguida, se espalha para os gânglios linfáticos e pela corrente sanguínea. Após o tempo de incubação da doença, que pode durar de 3 a 12 dias, apresentam-se na fase aguda, sintomas característicos como febre variável, rash cutâneo, artralgia, dor de cabeça, dor retro-orbital e conjuntivite (menos frequentemente), apesar destes sintomas, 80% dos infectados permanecem assintomáticos (HAYES, 2009; HEANG *et al.*, 2012). Quadros mais graves também tem sido associado a infecção pelo ZIKV, como a microcefalia em fetos e a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) em adultos (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2015; OEHLER *et al.*, 2014).

Após entrar em contato com a derme humana, o ZIKV é capaz de invadir diversos tipos celulares que vão desde a camada superficial até aquelas mais profundas da pele, como os queratinócitos, fibroblastos e células dendríticas. A entrada nas células ocorre via endocitose mediada por receptor específico, alguns pertencentes a família de receptores da fosfatidilserina: DC-SIGN, TAM (AXL e Tyro3) conferindo maior suscetibilidade de infecção, além de TIM-1 e TIM-4, os quais não oferecem uma suscetibilidade celular ao ZIKV tão significativa e não são encontrados em fibroblastos (HAMEL *et al.*, 2015; LINDENBACH *et al.*, 2013).

O pH ácido do endossomo promove a formação do peptídeo de fusão (trímeros de E), o qual interage com a membrana endocítica, ocasionando a perda do capsídeo e a liberação do RNA viral no citoplasma da célula. Uma vez liberado, o RNA está pronto para ser traduzido em uma poliproteína única, a qual é clivada durante e após a tradução, por proteases virais e do hospedeiro. Após a tradução, o complexo de replicação se une ao RNA viral, que agora serve como template para a síntese de uma molécula de RNA fita simples polaridade negativa (3'-5'), que atua como template para a síntese de novos RNAs fita simples polaridade positiva, que irão compor o nucleocapsídeo da nova progênie viral (Figura 3). Tal processo ocorre no citoplasma, e a partir de 6 horas pós infecção (hpi) já é possível observar uma alta atividade replicativa do vírus (HAMEL *et al.*, 2015; LINDENBACH *et al.*, 2013).

Figura 3 - Ciclo de Replicação dos Flavivírus

Fonte: Lindenbach *et al.* (2013, tradução nossa).

Legenda: O pH ácido do endossomo promove a formação do peptídeo de fusão, o qual interage com a membrana endocítica, ocasionando a perda do capsídeo e a liberação do RNA viral no citoplasma da célula para que ocorra a tradução.

Partindo do princípio que a replicação de todos os flavivírus ocorre acoplada a membranas intracelulares, o ZIKV induz a formação de vesículas citoplasmáticas e autofagossomas que contêm partículas virais esféricas eletrodensas e envelopadas em seu interior, além de favorecer a replicação e disseminação do vírus (BARRETO-VIEIRA *et al.*, 2016; HAMEL *et al.*, 2015; LINDENBACH *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2016).

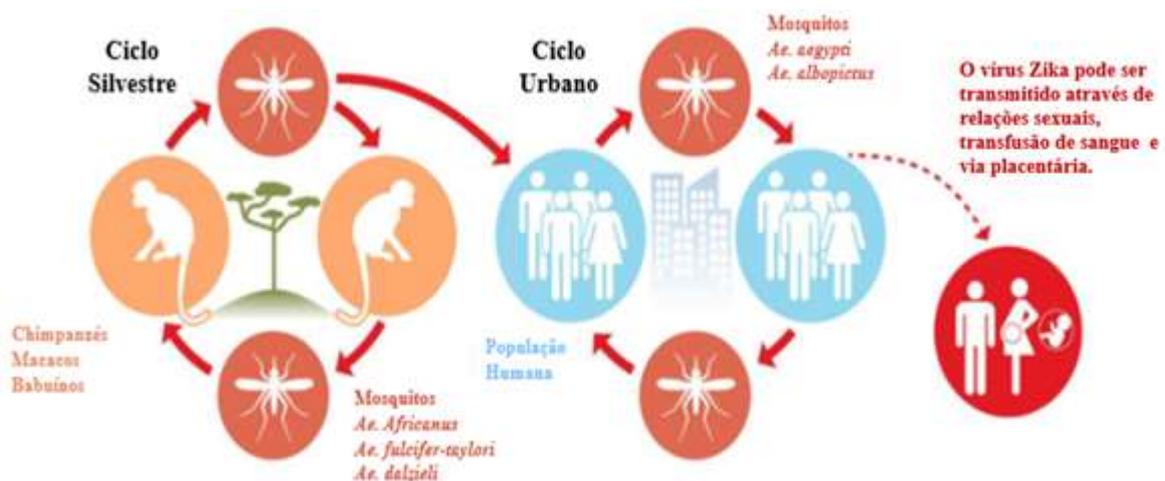
As proteínas estruturais entram na via morfogênica, que ocorre no interior de membranas intracelulares, mais comumente no RE. Inicialmente, várias cópias de C interagem com o RNA viral, formando o nucleocapsídeo. Os vírus imaturos formam os trímeros prM-E e impedem a exposição do peptídeo de clivagem à furina – enzima da célula hospedeira –, e conseqüentemente a fusão de E com membranas internas celulares que impossibilitaria a

liberação de novos vírions (LINDENBACH *et al.*, 2013). Na via secretória da célula hospedeira, ocorre a maturação da partícula viral que é mediada pelo rearranjo das glicoproteínas virais e pela clivagem da porção pr da prM, através da furina formando os vírions maduros que são liberados para o ambiente extracelular, aptos a infectar novas células (LINDENBACH *et al.*, 2013).

2.5 Transmissão do vírus Zika

O ZIKV apresenta dois ciclos de transmissão, um silvestre, mantido entre primatas não humanos e mosquitos, tendo os seres humanos e outros animais como hospedeiros acidentais, diferentemente do ciclo urbano, onde os seres humanos são os hospedeiros principais e junto com o mosquito mantém a circulação ativa do ZIKV nestas áreas (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; GUERBOIS *et al.*, 2016; VASILAKIS; WEAVER, 2017) (Figura 4).

Figura 4 - Ciclos de transmissão do vírus Zika.



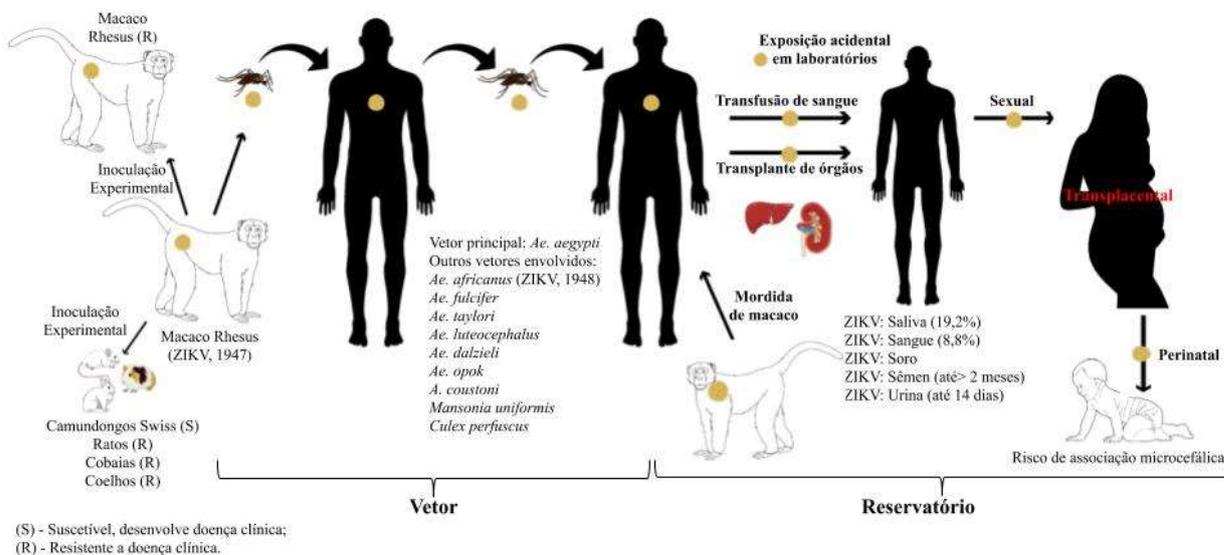
Fonte: Buitrago B. *et al.* (2017, tradução nossa).

Legenda: O ZIKV apresenta dois ciclos de transmissão, um silvestre, mantido entre primatas não humanos e mosquitos, tendo os seres humanos e outros animais como hospedeiros acidentais, diferentemente do ciclo urbano, onde os seres humanos são os hospedeiros principais

Desde a sua descoberta, o ZIKV tem sido referido como um vírus zoonótico de transmissão vetorial, ocasionada principalmente pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Aedes spp.* A fêmea de *Aedes* ao realizar hematofagia, injeta o vírus na pele humana, seguido pela infecção de células permissivas (BRIANT *et al.*, 2014).

A principal transmissão do ZIKV ocorre através da picada do mosquito *Aedes aegypti*, mas alguns estudos demonstraram que as transmissões vertical e sexual também podem ocorrer (ATKINSON *et al.*, 2016; BESNARD *et al.*, 2014; MARCHETTE *et al.*, 1969; MLAKAR *et al.*, 2016). Estudos recentes têm mostrado uma rota de transmissão bastante variada que compreende a transmissão transplacentária, perinatal, sexual, e transmissão através da transfusão de sangue e do transplante de órgãos (DIAGNE *et al.*, 2015; DIALLO *et al.*, 2014; McCRAE; KIRYA, 1982; RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2016). Ao que indica, a ampla gama de vias de acesso para o vírus, junto com condições ambientais propícias ao crescimento e proliferação do mosquito vetor tem contribuído para o surgimento das últimas epidemias (MOTA *et al.*, 2016) (Figura 5).

Figura 5 - Formas de transmissão do ZIK



Fonte: Rodriguez Morales; Bandeira e Franco Paredes (2016, tradução nossa).

Legenda: A principal transmissão do ZIKV ocorre através da picada do mosquito *Aedes aegypti*, mas alguns estudos demonstraram que as transmissões vertical, sexual, transmissão transplacentária, perinatal, sexual, e transmissão através da transfusão de sangue e do transplante de órgãos também podem ocorrer.

2.5.1 Transmissão vetorial

Várias espécies já foram identificadas como vetores potenciais do ZIKV incluindo o *Aedes africanus*— primeira espécie da qual o vírus foi isolado —*Aedes vitattus* e *Aedes unilineatus* (DIAGNE *et al.*, 2015; DIALLO *et al.*, 2014; McCRAE; KIRYA, 1982). Porém,

Aedes aegypti e o *Aedes albopictus* tem sido recentemente detectado como vetores principais da linhagem asiática do ZIKV, a qual tem causado uma recente epidemia que atingiu mais de 70 países em todo o mundo (CHOUIN-CARNEIRO *et al.*, 2016; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017; GUERBOIS *et al.*, 2016).

Segundo pesquisas, o clima destas regiões é favorável à manutenção destas espécies, que se adaptaram a regiões com climas temperados e tropicais, associado a cidades altamente populosas, com saneamento básico quase inexistente, e períodos de seca prolongados, tornando-os vetores potenciais do ZIKV (IMPERATO, 2016; VASILAKIS; WEAVER, 2017). O ZIKV também já foi isolado do *Culex quinquefasciatus* tanto de mosquitos selvagens quanto em mosquitos infectados em laboratório (GUEDES *et al.*, 2017).

2.5.2 Transmissão não-vetorial

Além da transmissão vetorial o ZIKV pode ser transmitido por transmissão vertical, transfusão de sangue e transplante de órgãos.

2.5.2.1 Transmissão vertical

A transmissão vertical do ZIKV é um dos muitos desafios que cientistas e órgãos de saúde pública têm enfrentado. Isto porque tal via de transmissão está diretamente relacionada com o desenvolvimento de microcefalia, e de outras malformações do SNC em recém-nascidos. Desde 2013 já existem evidências desta via como rota potencial de transmissão para o ZIKV, porém, somente a partir da epidemia que ocorreu no Brasil e em outros países das Américas, é que se pôde confirmá-la como via secundária de infecção para o vírus (BESNARD *et al.*, 2014; OLIVEIRA, M. *et al.*, 2016; WERNER *et al.*, 2016).

A transmissão da mãe-filho pode ocorrer de duas formas: perinatal – que se dá no momento do nascimento ou através do aleitamento materno como descrito por Besnard *et al.* (2014); e transplacentária – neste caso, o vírus cruza a barreira transplacentária e causa sérios problemas no desenvolvimento fetal. Uma vez infectada, o vírus tende a permanecer detectável por até 46 dias após o início dos sintomas no soro da gestante (MEANEY-DELMAN *et al.*, 2016; WERNER *et al.*, 2016).

2.5.2.2 Transmissão sexual

A transmissão sexual tem contribuído para a ampla disseminação do ZIKV, visto que possibilita a entrada do vírus em diversos países, inclusive naqueles inabitados pelos mosquitos *Aedes spp.* (BAUD *et al.*, 2016; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017; FOY *et al.*, 2011). As primeiras evidências da transmissão sexual do ZIKV surgiram a partir da detecção do RNA viral no sêmen de homens que apresentaram sinais e sintomas clínicos característicos da infecção após viajarem para áreas endêmicas, além de transmitirem o vírus para suas parceiras sexuais que não tinham história de viagem recente para países com transmissão ativa do vírus (ATKINSON *et al.*, 2016; FOY *et al.*, 2011). Atualmente já existem relatos de transmissão de homem-mulher, mulher-homem e de homem-homem. Além disso, o intercuro vaginal é considerado a principal via de transmissão sexual, porém a infecção também pode ocorrer através de relações com intercuro oral ou anal (MOREIRA *et al.*, 2017).

Hoje a transmissão sexual é considerada um problema de saúde pública não somente devido a um número cada vez mais crescente de países que tem relatado casos de infecção por esta via, mas também pela persistência do vírus por períodos prolongados em amostras de sêmen, que segundo Nicastrì *et al.* (2016) pode ser detectado por até 6 meses após o aparecimento dos sintomas (MOREIRA *et al.*, 2017; RASMUSSEN *et al.*, 2016; SOUTO *et al.*, 2016).

2.5.2.3 Transfusão de sangue e transplante de órgãos

A transmissão do ZIKV na medicina transfusional é importante devido ao grande número de pacientes assintomáticos, como também ao grande número de arboviroses que são transmitidas pelo sangue. De acordo com Musso *et al.* (2014) e Kuehnert *et al.* (2016) a incidência da infecção com ZIKV entre os doadores de sangue na Polinésia Francesa e de Porto Rico é de 3% e 0,53%, respectivamente. Em um caso recentemente relatado no Brasil, apenas o concentrado de plaquetas havia sido transfundido durante uma cirurgia de transplante de fígado, de acordo com investigação laboratorial o RNA do ZIKV foi detectado tanto em amostras do doador quanto do receptor, porém, apenas o doador apresentou sintomas característicos da infecção (BARJAS-CASTRO *et al.*, 2016).

Em um estudo realizado na Polinésia Francesa, 1505 doadores foram testados por RT-PCR. Os autores relataram que 3% dos doadores eram positivos (42 de 1505 doadores). Apenas

11 desses doadores (26%) relataram sintomas. Portanto, a maioria dos doadores se mantiveram assintomáticos. A disponibilidade de um teste de laboratório licenciado para triagem sanguínea sistemática do ZIKV, ajudaria a determinar a prevalência de infecções assintomáticas entre doadores em epidemias e poderia aumentar a segurança do sangue nas transfusões (PATY, 2013).

2.6 Sinais e sintomas clínicos causados pelo vírus Zika

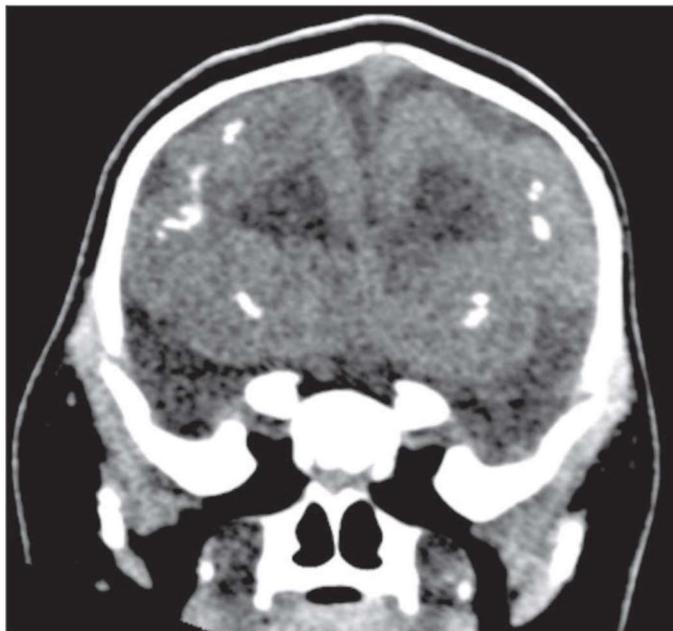
O quadro clínico da doença tende a ser brando com evolução autolimitada, caracterizando-se por febre baixa ou inexistente, mal-estar, cefaléia, exantema maculopapular pruriginoso ou não, conjuntivite, dor retroorbital, artralgia e vômito. O período de incubação da doença é de dez dias, e após o surgimento dos primeiros sinais e sintomas, estes tendem a persistir por 6 a 7 dias. Aproximadamente 80% dos pacientes são assintomáticos, porém algumas pessoas tendem a evoluir para quadros mais graves da doença, como microcefalia, malformações do sistema nervoso central e lesões óticas em fetos de mães infectadas, ou, síndrome de Guillain-Barré em adultos (DE PAULA *et al.*, 2016; DUFFY *et al.*, 2009; LUZ; SANTOS; VIEIRA, 2015; MARTINES *et al.*, 2016; ZANLUCA *et al.*, 2015). Além disto, crianças podem apresentar infecção recorrente frente ao estresse ou outros fatores desencadeantes, e, pacientes imunossuprimidos podem apresentar sintomas viscerais graves e até fatais (LUZ; SANTOS; VIEIRA, 2015).

2.6.1 Síndrome Congênita do Zika

A possível relação da infecção por ZIKV como causa de microcefalia tornou-se ainda mais evidente quando o RNA e antígenos do ZIKV foram detectados no tecido cerebral de dois recém-nascidos que vieram a óbito 20 horas após o parto, e em tecidos placentários de 2 abortos. As mães de todos eles disseram ter apresentado sintomas característicos da febre do ZIKV, como rash e febre, no primeiro trimestre da gravidez. A partir daí vários estudos foram conduzidos com o objetivo de desmistificar esta relação presuntiva, assim denominada, pela inexistência de testes sorológicos acurados que pudessem estabelecer uma relação definitiva entre ambas as patogenias (MARTINES *et al.*, 2016, OLIVEIRA, M. *et al.*, 2016).

Atualmente já foram identificadas relações causais da infecção pelo ZIKV como fator desencadeante de microcefalia e de outras malformações congênitas (MARTINES *et al.*, 2016; OLIVEIRA, M *et al.*, 2016) (Figura 6).

Figura 6 - Tomografia de um recém-nascido com síndrome congênita do ZIKV.



Fonte: Costa *et al.* (2016).

Legenda: Tomografia computadorizada (plano oblíquo coronal) de um recém-nascido com microcefalia e outras malformações do SNC associado a infecção com ZIKV

A microcefalia é uma desordem neurológica de causa multifatorial que pode ser desencadeada por mutações genéticas, uso de álcool e/ou drogas durante o período gestacional, injúria cerebral, e infecção com Citomegalovírus (CMV), Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Toxoplasmose, Rubéola, e agora, o ZIKV (FAHEEM *et al.*, 2015). De acordo com Mawson. (2016) a microcefalia associada a infecção pelo ZIKV pode estar relacionada a hipervitaminose A, visto que o genoma viral pode ser capaz de interagir com retinóides endógenos e aumentar o metabolismo do ácido retinóico, que em concentrações elevadas na circulação materno-fetal pode ser tóxico. Porém de acordo com Tang *et al.* (2016) o ZIKV infecta e se replica muito mais eficientemente em células progenitoras neurais quando comparadas a células nervosas mais diferenciadas, além de promover a morte destas células e uma desregulação do ciclo celular por ativação de Casp3, a qual está envolvida na regulação da via apoptótica (GUO, 2016; TANG *et al.*, 2016).

A doença é caracterizada por circunferência da cabeça três desvios padrão abaixo do considerado normal, de acordo com a idade e sexo, para a OMS o tamanho normal seria de 30,3 cm para feminino a termo e de 30,7 para masculino a termo durante a primeira semana de vida. Diversas alterações podem ser observadas no SNC incluindo, atrofia cerebral acentuada, ventriculomegalia, calcificações intracranianas extensivas, padrão giral simplificado, disgênese

do corpo caloso e hipoplasia cerebelar (COSTA *et al.*, 2016; DE ONIS *et al.*, 2004; OLIVEIRA, M *et al.*, 2016) (Figura 7).

Figura 7 - Características e achados clínicos em neonatos com a síndrome congênita do Zika.



Fonte: Adaptada de Meneses *et al.* (2017).

Legenda: Achados clínicos em recém-nascidos que nasceram com a síndrome congênita do Zika. Desproporção craniofacial (A), malformação das articulações (Artrogrípse) (B) e calcificações cerebrais obtidas a partir de uma tomografia computadorizada (C).

Outras consequências da infecção intra-uterina podem ser calcificação cerebral e crescimento intrauterino restrito na ausência de microcefalia, além de outras deformações do SNC – artrogrípse, hidranencefalia – lesões oculares, perda auditiva e, morte fetal (BRASIL *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2016; OLIVEIRA M. *et al.*, 2016; SARNO *et al.*, 2016).

2.6.2 Síndrome Congênita do Zika e Condições Oftalmológicas

De acordo com a literatura, a infecção com o ZIKV durante o período gestacional pode estar relacionada a maiores incapacidades ao longo da vida, como o comprometimento ocular dos recém-nascidos (COSTA *et al.*, 2016; VENTURA *et al.*, 2016). As primeiras alterações oculares foram relatadas por Ventura e colaboradores, em 2016, que detectaram perda do reflexo fetal e pigmentação macular grosseira em três crianças, além de atrofia neuroretiniana macular em uma delas. De acordo com estudo realizado por Freitas *et al.* (2016) de 29 crianças com microcefalia, 10 apresentaram alguma anormalidade ocular, dentre elas pigmentação focal, atrofia coriorretiniana especialmente da área macular, hipoplasia do nervo óptico e sub-luxação da lente, porém, de acordo com Costa *et al.* (2016) algumas alterações óticas também podem ocorrer em bebês normocefálicos que nasceram de gestantes com relato prévio de doença exantemática, o que alerta para uma possível necessidade de acompanhamento desse grupo. Tamanho assimétrico dos olhos, catarata, estrabismo e nistagmo horizontal também já foram relatados (McCARTHY, 2016; VENTURA *et al.*, 2016).

2.6.3 SGB e Outras Complicações Neurológicas

O ZIKV é um vírus neurotrópico que tem desencadeado quadros neurológicos variados, como a SGB e a mielite aguda (BRAULT *et al.*, 2016; MÉCHARLES *et al.*, 2016). A SGB tem se apresentado em pacientes com infecção prévia com o ZIKV desde o surto que ocorreu na Polinésia Francesa em 2013, e desde que o vírus começou a circular no Brasil, a prevalência de SGB também começou a aumentar, justamente nas áreas de transmissão ativa do ZIKV. Clinicamente, os pacientes apresentam as primeiras alterações neurológicas a partir do sexto dia pós infecção e tem progressão rápida da doença, caracterizando-se por fraqueza dos membros inferiores, perda da habilidade motora, parestesia das extremidades, mialgia difusa, e em casos mais graves, apresentam-se com paralisia dos músculos respiratórios, o que exige tratamento para insuficiência respiratória (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014; OEHLER *et al.*, 2014; OLIVEIRA, M. *et al.*, 2016).

De modo geral, o tratamento baseia-se na administração de imunoglobulinas e/ ou de concentrados de plasma por via intravenosa, e tem uma média de internamento de 13 dias. O ideal é que tanto o correto diagnóstico quanto o tratamento sejam realizados o mais rápido possível, pois são cruciais para uma melhor evolução do quadro clínico do paciente (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014; HUGHES *et al.*, 2005; OEHLER *et al.*, 2014).

Além da SGB, outras patologias do sistema nervoso já foram identificadas em pacientes que viajaram ou vivem em regiões endêmicas para o ZIKV e que tem relatado sinais e sintomas clínicos da infecção, como é o caso da mielite aguda, e da meningoencefalite aguda que foram relatadas por Mécharles *et al.* (2016) e por Carteaux *et al.* (2016) respectivamente.

2.6.4 Complicações Hematológicas

A trombocitopenia imunomediada presumida foi uma complicação da febre do Zika recentemente descrita por Karimi e colaboradores, em 2016. Segundo este mesmo estudo, a paciente apresentava hematomas em ambos os braços e pernas além de trombocitopenia profunda com 10×10^9 plaquetas/L. A associação causal com o ZIKV foi devido a presença do RNA viral em amostra de sangue e de urina por qRT-PCR, associada a viagem para o Suriname – área endêmica para o ZIKV. O tratamento foi realizado com administração intravenosa de imunoglobulinas, e após isso, a paciente evoluiu clinicamente bem (KARIMI *et al.*, 2016).

2.7 Utilização de camundongos *knockout* em estudos com o vírus Zika

Com aumento gradativo do número de casos relacionados ao ZIKV no século 21, houve um grande esforço da comunidade científica para aprender mais sobre este vírus, sendo um dos principais objetivos o de desenvolver modelos animais para uso no delineamento do ciclo infeccioso, identificar as consequências da infecção e descobrir novas medidas profiláticas (BRADLEY, M. P. *et al.* 2017 ; MORRISON; DIAMOND, 2017).

Uma avaliação adequada dos sintomas causados pelo ZIKV depende do estabelecimento da viremia, o que não ocorre de maneira eficaz em camundongos imunocompetentes. (LI, S. *et al.* 2016). Os modelos de camundongos utilizados até o momento nas principais investigações com este vírus são deficientes na produção, em receptores ou na sinalização de interferons (IFN), causados geneticamente ou através de tratamento com anticorpos específicos (MINER *et al.*, 2016). O caráter protetor associado ao IFN- γ , por exemplo, tem sido observado em vários estudos que avaliaram o perfil de susceptibilidade à infecção (WIDMAN *et al.*, 2017).

Os IFNs são citocinas que desempenham um papel importante na resposta imune e na defesa contra os vírus. Historicamente, os IFNs foram divididos em duas classes principais: tipo I (estável em ácido) e tipo II (instável em ácido), com base na sua capacidade de manter a atividade biológica em condições ácidas. A sinalização do IFN-I (IFN- α , β) ocorre através do complexo heterodimérico IFNAR1-IFNAR2, que ativa quinases JAK1 e TYK2 e causam dimerização dos fatores STAT1 e STAT2, os quais se ligam ao elemento de resposta estimulado por IFN. Já o IFN do tipo II (IFN- γ) através de sinais do complexo heterodimérico IFNGR1-IFNGR2, ativa as quinases JAK1 e JAK2 e provoca dimerização do fator STAT1, que se liga ao promotor GAS (SMILOVIĆ *et al.*, 2008). O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores sendo o IFN-I (α/β) a maior arma na defesa antiviral contra todos os tipos de vírus (HALLER; KOCHS; WEBER, 2005).

A produção de IFN-I após infecção viral é provocada pelo reconhecimento de estruturas conservadas dos patógenos ou produtos conhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) por sensores específicos do hospedeiro conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs) (DAFFIS *et al.*, 2008). Após a detecção do patógeno viral, a célula ativa múltiplas vias distintas de sinalização para induzir uma série de fatores de transcrição, que por sua vez levam a uma reprogramação do perfil de expressão gênica e a indução de uma grande variedade de genes que estabelecem um estado antiviral (FREDERICKSEN *et al.*, 2008).

Utilizando linhagens de camundongos deficientes em vários componentes da sinalização antiviral, pesquisadores já mostraram o papel crítico da ausência da sinalização do IFN tipo I, II e III na prevenção da infecção pelo ZIKV (ALIOTA *et al.*, 2016; DOWALL *et al.*, 2016; GOVERO *et al.*, 2016; LAZEAR *et al.*, 2016). Animais que possuem a deficiência na produção, em receptores ou na sinalização de interferons são altamente suscetíveis à infecção pelo vírus e mantêm a infecção com altas cargas virais no cérebro e na medula espinhal, equivalente com a grave manifestação neurológica e altas cargas virais nos testículos causados por este vírus observadas em humanos (ALIOTA *et al.*, 2016; DOWALL *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2016).

Utilizando camundongos das linhagens imunodeficientes A129 e AG129, Rossi e colaboradores, em 2016, propôs a caracterização de um modelo murino para o estudo da infecção causada pelo ZIKV. Esse trabalho mostrou que o vírus se espalha em diferentes órgãos (coração, pulmão, fígado, baço, rins, músculo quadríceps, cérebro e testículos) e embora o vírus tenha sido detectado em todos os órgãos mencionados, os principais locais de replicação foram o baço, testículos e cérebro.

A linhagem AG129 de camundongos, não possuem receptores para o interferon α / β (IFN α / β) e interferon γ (IFN γ) e por isso se demonstraram suscetíveis a infecção pelo ZIKV por várias vias de inoculação (ALIOTA *et al.*, 2016; ZMURKO *et al.*, 2016) (Figura 8). Esses animais foram originalmente desenvolvidos para estudos relacionados com a patogênese do DENV (SHRESTA *et al.*, 2004), mas hoje em dia são utilizados extensivamente na pesquisa sobre a infecção do ZIKV, sendo considerados animais muito susceptíveis à doença induzida por este vírus. (GOVERO *et al.*, 2016; LAZEAR *et al.*, 2016).

Figura 8 - Camundongo da linhagem AG129

Fonte: Nicole Navratil (2016).

Nota: Camundongos AG129 não possuem receptores para o interferon α / β (IFN- α / β) e interferon γ (IFN- γ).

Análises histológicas de camundongos AG129 infectados com o ZIKV, identificaram em todo o sistema nervoso central, neurônios positivos para o antígeno do vírus, com desfechos neurodegenerativos como encefalite neutrofílica multifocal e mielite (JULANDER *et al.*, 2017). A observação do vírus em neurônios motores no corno ventral da medula espinhal foi semelhante à doença já observada em hamsters após a infecção pelo vírus do Nilo Ocidental (SIDDHARTHAN, V. *et al.*, 2009).

Os astrócitos também foram fortemente infectados em várias regiões do cérebro e medula espinhal após a infecção pelo ZIKV, semelhante à patologia observada após o desafio de camundongos da linhagem C3H/HeN com o vírus da encefalite equina venezuelana, um alfavírus (JULANDER, J. G. *et al.*, 2008). Acredita-se que a gravidade dos sinais neurológicos observados nesse modelo após a infecção pelo ZIKV, esteja relacionado ao fato de que o IFN- γ possa desempenhar um papel neuroprotetor (LOBIGS *et al.*, 2003).

Órgãos do sistema reprodutor de camundongos AG129 também já foram avaliados pós infecção. Weger-Lucarelli e colaboradores avaliaram, em 2017, a patogênese e a transmissão sexual utilizando a cepa viral PRVABC59; Puerto Rico 2015 (LANCIOTTI *et al.*, 2016) e observaram que as células testiculares contribuíam como fonte de reserva viral. Através de

imuno-histoquímica, foi possível detectar antígenos virais em células epiteliais do epidídimo e testículo até 33 dias após a infecção.

Zmurko *et al.* (2016) comparou resultados obtidos de camundongos AG129 com perfil observado para camundongos SCID (deficientes em linfócitos T e B) para testar os efeitos do inibidor da polimerase 7-Deaza-2'-C-Metiladenosina. Mesmo com uma doença mais grave, a linhagem SCID provaram ser mais resistente à infecção do que o modelo AG129, sugerindo que a infecção pelo ZIKV em camundongos é controlada principalmente pela resposta imune inata que é mediada por interferon em vez de celular (resposta adaptativa). Este mesmo estudo mostrou que o modelo AG129 têm uma resposta inflamatória sistêmica mediada por citocinas pró inflamatórias (ZMURKO *et al.*, 2016).

Camundongos AG129 infectados exibem degeneração de miofibras de membros posteriores e necrose sugerindo que o ZIKV pode infectar células musculares. O antígeno viral, no entanto, não foi diretamente observado no tecido muscular (ALIOTA *et al.*, 2016).

Outro modelo animal que está sendo amplamente utilizado na condução de estudos com o ZIKV é o camundongo A129, linhagem nocaute para expressão de receptores de IFN α / β (Figura 9). Estes animais foram os primeiros a serem utilizados para caracterizar a infecção por este vírus, embora também já tenha sido utilizado em estudos com outros vírus como o CHIKV e YFV (DOWALL *et al.*, 2016; MEIER *et al.*, 2009; PLANTE *et al.*, 2015).

Figura 9 - Camundongo da linhagem A129



Fonte: O autor.

Nota: Camundongos A129 são nocaute para expressão de receptores de IFN- α / β .

Camundongos A129 infectados com a linhagem asiática H/ PF/ 2013, americana (Brasil Paraíba_2015) ou africana (MR766) do ZIKV foram permissivos à infecção e vulneráveis à patologia e mortalidade relacionadas ao vírus. Camundongos C57BL/6 normais, apresentaram efeitos similares, porém estes animais foram tratados com anticorpos anti-IFNAR1 (que suprimem a expressão de interferon tipo I) e posteriormente inoculados com a cepa africana (estirpe Dakar 1984) do ZIKV (MORRISON; DIAMOND, 2017).

Em estudos com camundongos A129 verificou-se que a presença do vírus no cérebro precedeu o aparecimento de sinais neurológicos em cerca de dois dias, uma cinética semelhante ao que ocorre com outros flavivírus neurotrópicos (LOBIGS *et al.*, 2003). Estudos anteriores, mostraram através de análises histológicas, lesões microscópicas no cérebro de camundongos A129 infectados pelo ZIKV (BELL, T. M. *et al.*, 1970; DOWALL *et al.*, 2016). Embora as lesões mais significativas referentes à infecção pelo vírus nos camundongos foram aquelas observadas no cérebro, outros órgãos como baço, fígado e testículos também sofrem alterações causadas pela exposição ao vírus (BELL *et al.*, 1970; DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; DOWALL *et al.*, 2016).

Camundongos A129 inoculados com 1×10^5 PFU/ml do ZIKV via intraperitoneal ou intradérmica, apresentam cargas virais em vários órgãos, incluindo o baço, cérebro e testículos, comprovando assim, o potencial destes animais para estudos *in vivo* com o ZIKV (ROSSI *et al.*, 2016).

Outros modelos de camundongos *knockout* da via do IFN apresentam graus variados de gravidade da doença após a infecção pelo ZIKV e por isso também podem ser considerados um modelo animal adequado para estudos da replicação viral em tecidos. A presença de receptores IFN- γ por exemplo, proporciona proteção intermediária em camundongos de 5 semanas e sobrevivência completa em camundongos com 11 semanas de idade. Sendo assim, camundongos *knockout*, IFN γ receptor deficientes, são suscetíveis à infecção. Esses camundongos já foram utilizados para comparar a patogenicidade de várias cepas do ZIKV (WIDMAN *et al.*, 2017).

Pesquisas anteriores também já demonstraram que o ZIKV é letal para camundongos da linhagem IFNAR1 deficientes em receptores IFN α/β (ROSSI *et al.*, 2016). A transmissão do vírus por mosquitos em camundongos IFNAR1 deficientes ajudou a identificar a competência vetorial para várias cepas do vírus (ROUNDY *et al.*, 2017).

Estudos utilizando camundongos da linhagem IFNAR1 deficientes com 5 semanas de idade, desafiados com a cepa africana MR 766, demonstraram que apesar de apresentarem um início tardio da doença, ocorre 80% de letalidade entre os animais (DOWALL *et al.*, 2016; GOVERO

et al., 2016; LAZEAR *et al.*, 2016). Neste estudo, o RNA viral estava presente em maiores níveis no cérebro, seguido por ovário e baço e níveis mínimos foram constatados no fígado (TRIPATHI *et al.*, 2017).

Camundongos IFNAR^{-/-} infectados com cepas do ZIKV da Polinésia Francesa ou do Brasil desenvolveram conjuntivite e panuveíte, e estas manifestações da doença foram associadas a presença do vírus na córnea, íris, nervo óptico, células ganglionares e bipolares na retina. Assim, IFNAR^{-/-} também podem ser úteis na investigação da patogênese da doença ocular associada a infecção pelo ZIKV (MINER *et al.*, 2016).

Posteriormente, camundongos *knockout* triplos como o irf3^{-/-} irf5^{-/-} irf7^{-/-} que são comprometidos na indução do IFN tipo I, II e III mostraram-se mais susceptíveis à indução do ZIKV em comparação com camundongos Ifnar1^{-/-} apontando para importância de resposta de IFN tipo II e III contra a infecção (GOVERO et al., 2016; LAZEAR *et al.*, 2016).

Enquanto os camundongos Ifnar1^{-/-} não possuem sinalização IFN tipo I, a linhagem STAT2^{-/-} não possuem sinalização IFN tipo I e tipo III (SCHNEIDER; CHEVILLOTTE; RICE, 2014). Embora a proteína NS5 do vírus evite a resposta de sinalização do IFN humano por ligação e degradação do STAT2, esta é incapaz de se ligar eficientemente em camundongos STAT2^{-/-} e, portanto, carece da capacidade de antagonizar a resposta do IFN destes animais (BOWEN *et al.*, 2017; GRANT *et al.*, 2016; KUMAR, A. *et al.*, 2016).

Foi demonstrado que o ZIKV evita a defesa antiviral do hospedeiro mediada por IFN ao direcionar o transdutor de sinal ativador da transcrição 2 (STAT2), consistentemente, o camundongo com deficiência de STAT2 é vulnerável à infecção (ZHANG FENG *et al.*, 2017). Assim, camundongos *knockout* STAT2^{-/-} e camundongos sem fatores de resposta de IFN III, são suscetíveis à infecção pelo ZIKV (GOVERO et al., 2016; LAZEAR *et al.*, 2016 e TRIPATHI *et al.*, 2017).

Para investigar se a eliminação do STAT2 em camundongos era suficiente para tornar os animais susceptíveis a infecção pelo vírus, Tripathi *et al.* (2017) desafiaram camundongos STAT2^{-/-} C57BL/6 de 5 a 6 semanas de idade com a cepa viral isolada em Uganda, MR-766, 1947. Três dias pós infecção os animais apresentaram letargia e movimentos limitados e com 6 dias pós infecção os animais sucumbiram a doença. Exames de carga viral demonstraram a presença RNA viral no cérebro, ovário, baço e fígado dos camundongos infectados.

Todos estes estudos mostram que modelos de camundongos imunocomprometidos têm sido úteis na recapitulação da infecção pelo ZIKV e em demonstrar o papel crítico da indução e sinalização de IFN para proteção contra este vírus (ALIOTA *et al.*, 2016; DOWALL *et al.*, 2016; GOVERO et al., 2016; LAZEAR *et al.*, 2016).

2.8 Camundongos selvagens como modelo experimental em estudos com o vírus Zika

Estudos iniciais investigando o ZIKV logo após sua descoberta incluiu o desafio de várias linhagens de camundongos, bem como um modelo de desafio humano (BEARCROFT, 1956 e REAGAN *et al.*, 1954). Estes primeiros estudos demonstraram que camundongos selvagens adultos eram resistentes a infecção pelo vírus (WAY *et al.*, 1976). Tem sido então, um desafio infectar camundongos adultos imunocompetentes de forma produtiva através de uma rota de infecção. A replicação viral é prontamente abortada pela resposta imune inata antes da sua disseminação sistêmica (ALIOTA *et al.*, 2016; GOVERO *et al.*, 2016; LAZEAR *et al.*, 2016).

Anticorpos anti-flavivírus pré-existentes estão implicados em doenças agravadas durante a infecção, um conceito conhecido como aumento de anticorpos da doença. Este fenômeno é bem conhecido em casos com DENV, onde os anticorpos para uma cepa se ligam em níveis baixos a uma cepa heterotópica, resultando em uma maior captação de vírus pelas células portadoras de receptores Fc do sistema imunológico. A infecção dessa maneira aumenta efetivamente as células hospedeiras disponíveis para a replicação viral e aumenta o antígeno, a carga, a resposta do hospedeiro e a imunopatologia da infecção (HALSTEAD, 2015). Isto foi demonstrado em modelos de camundongos com imunodeficiência de infecção por DENV (BALSITIS *et al.*, 2010 e ZELLWEGGER *et al.*, 2010). A doença aumentada também foi observada em camundongos infectados com o ZIKV após o tratamento com anticorpos contendo soro imune para DENV ou vírus do Nilo Ocidental (BARDINA *et al.*, 2017).

O uso de anticorpos bloqueadores de função (MAR1-5A3) que visam a inibição dos receptores IFN α/β também podem fazer com que os animais fiquem com maior suscetibilidade à infecção pelo ZIKV após o desafio. Já foi possível detectar o RNA viral no cérebro e também no hipocampo de animais tratados previamente com o anticorpo bloqueador (SMITH *et al.*, 2017).

Outro método para estudo com o ZIKV em animais imunocompetentes adultos foi demonstrado em camundongos da linhagem BALB/c. A imunossupressão da dexametasona tornou esses animais suscetíveis à infecção pelo vírus, resultando em títulos virais detectáveis em vários tecidos e a morte dos animais (CHAN *et al.*, 2016).

Gorman e colaboradores também buscaram, em 2018, outra alternativa de superar a restrição de infecção de camundongos adultos imunocompetentes. Estes, realizaram passagens seriadas via subcutâneo em camundongos C57BL/6 de 4 a 6 semanas de idade, utilizando a

cepa viral Dakar 41525, Senegal, 1984. A utilização de uma cepa africana se deu devido à sua maior patogenicidade em camundongos selvagens neonatos quando comparada as cepas asiáticas (GOVERO *et al.*, 2016; LAZEAR *et al.*, 2016). A cepa adaptada foi inoculada em um novo grupo de animais e estes não sucumbiram a doença, embora a avaliação de carga viral tenha mostrado que animais que receberam a cepa adaptada apresentavam uma carga de RNA viral maior em diferentes partes do cérebro quando comparado aos animais que receberam a cepa parental.

Sabendo que camundongos deficientes em STAT2 são vulneráveis a infecção pelo ZIKV, Gorman *et al.* (2018) criaram um modelo animal transgênico onde o STAT2 dos animais foi substituído por STAT2 humano (hSTAT2). Como a proteína NS5 do ZIKV evita a resposta de sinalização do IFN humano por ligação e degradação do STAT2 (BOWEN *et al.*, 2017; GRANT *et al.*, 2016; KUMAR, A. *et al.*, 2016), os animais infectados sucumbiram a doença, apresentando carga viral em tecidos e órgãos e letalidade de 30% do grupo experimental.

A infecção pelo ZIKV também já foi estudada em camundongos neonatos do tipo selvagem (FERNANDES *et al.*, 2017; GOVERO *et al.*, 2016; LAZEAR *et al.*, 2016; MANANGEESWARAN *et al.*, 2016; MINER *et al.*, 2016). Camundongos neonatos podem ser modelos úteis, pois os principais processos de desenvolvimento do cérebro em roedores ocorrem no período pós-natal, em contraste com o caso dos seres humanos, onde ocorrem durante o terceiro trimestre do desenvolvimento fetal (SEMPLE *et al.*, 2013). A infecção de camundongos neonatos logo após o nascimento também resulta em morbidade e mortalidade, com doença mais grave e morte (FERNANDES *et al.*, 2017).

Recentemente Li, S. *et al.* estudaram as complicações causadas pelo ZIKV em camundongos neonatos selvagens das linhagens BALB/c, C57BL/6, ICR e Kunming (KM). Os resultados mostraram que o vírus pode causar 100% de letalidade em C57BL/6 e KM de 1 dia, 75% em ICR, mas nenhuma morte foi observada camundongos BALB/c. Todos os neonatos infectados desenvolveram complicações neurológicas, incluindo tremores, paralisia de membros e letargia, com vírus detectáveis no sangue, urina, cérebro, medula espinhal, coração, fígado, pulmão, baço, intestino, rim, fibra muscular dos membros anteriores e posteriores, timo e testículo.

Camundongos neonatos C57BL/6, infectados com 5×10^6 TCID_{50/ml} do ZIKV, foram incapazes de manter o equilíbrio, indicando uma conexão com a fraqueza dos membros superiores ou inferiores, relacionado à hiporreflexia ou arreflexia (YU, J. *et al.*, 2017). Manangeeswaran (2016) também inocularam camundongos C57BL/6 de 1 dia de idade com a cepa viral PRVABC59. Neste estudo verificou se doença neurológica não fatal caracterizada

por manifestações neurológicas, como tremores, convulsões, caminhada instável, perda de equilíbrio e ataxia, os animais desenvolveram seus sintomas por volta de 13 dias após a infecção e se recuperaram duas semanas depois. Estes sinais de doença foram associados com a infecção pelo vírus no cérebro e neurodegeneração no cerebelo.

A linhagem BALB/c também foi avaliada nos experimentos de Yu Jianhai *et al.* (2017) onde a morbidade dos camundongos neonatos BALB/c foi de apenas 39,4%, com apresentação de sinais clínicos não uniformes. Alguns indivíduos apresentaram um leve purido extraocular amarelo, o que sugeriu a presença de alterações oculares. A conjuntivite é uma das características clínicas já demonstrada durante a infecção pelo ZIKV (BRASIL *et al.*, 2016). Ventura e colaboradores analisaram, em 2016, três casos de maculopatia ocular em crianças com suspeita de infecção congênita por Zika. Complicações oculares também já havia sido relatada em outros estudos utilizando camundongos neonatos associado a infecção via placentária pelo ZIKV (DE PAULA *et al.*, 2016; MIRANDA *et al.*, 2016).

Camundongos neonatos da linhagem Swiss com 1 dia de idade, inoculados por via subcutânea ou intracraniana com a cepa viral ZIKV SPH 2015 sucumbem a doença e apresentam os fenótipos causados pela infecção (CUNHA *et al.*, 2016). A infecção de camundongos Swiss pela cepa viral SPH 2015, levou os animais a apresentarem sinais clínicos incluindo letargia, ataxia e paralisia. Inflamação extensa estava presente nos cérebros de ambos os grupos infectados (inoculados via subcutânea ou intracraniana), com o córtex cerebral como principal área afetada. Chama se a atenção para 2 dos 4 camundongos inoculados por via subcutânea que apresentaram bexiga urinária atônica (FERNANDES *et al.*, 2017). A atonicidade da bexiga urinária também já foi relatada em um caso de infecção em humano causado pelo ZIKV (MÉCHARLES *et al.*, 2016).

Embora camundongos imunocompetentes não apresentem os sinais clínicos causados pelo ZIKV, em alguns casos é possível constatar a viremia e a carga viral em tecidos e órgãos por um determinado período de tempo. Avaliações utilizando as linhagens C57BL/6, BALB/C e SJL mostraram variáveis de suscetibilidade entre camundongos de 10 a 12 semanas após desafio a cepa viral denominada Brasil ZKV2015. Nesse estudo, tanto o BALB /C quanto SJL apresentaram uma viremia significativamente maior do que a constatada em camundongos C57BL /6 (LAROCCA *et al.*, 2016).

A inoculação via intraperitoneal ou intravaginal da cepa viral FSS13025 em camundongos C57BL/6 com 8 a 10 semanas de idade levou a constatação da presença do RNA viral na vagina até 4 dias pós infecção. Este mesmo estudo demonstrou que o baço dos animais infectados continha uma alta carga viral (YOCKEY *et al.*, 2016). Entretanto quando inoculados

via subcutânea, camundongos C57BL/6 com a mesma cepa viral, porém com 6 semanas de idade não foi constatado viremia e sinais clínicos da doença (ROSSI *et al.*, 2016).

Govero *et al.* (2016) e Lazear *et al.* (2016), também avaliou camundongos imunocompetentes da linhagem C57BL/6 como modelo de infecção para o ZIKV. Neste estudo, os animais foram inoculados via subcutânea ou intravenosa com uma cepa viral de origem africana (MR766) e uma cepa de origem asiática (H/PF/2013). Em ambos grupos experimentais os animais não apresentaram sinais clínicos da doença, embora tenha sido apresentada uma viremia transitória.

A coinfeção também já foi utilizada para avaliar camundongos imunocompetentes. Devido à sobreposição em sequência entre os vírus dengue e Zika, é possível que o aumento da capacidade de infecção também desempenham um papel na patogênese do Zika, como foi demonstrado em modelos de roedores. No entanto, não há evidências clínicas para apoiar essa idéia, e deve-se tomar cuidado para não interpretar erroneamente os dados. Além disso, a montagem de dados de epidemiologia e estudos em primatas não humanos sugerem que os anticorpos contra o DENV desempenham mais um papel protetor, em vez de um papel no aprimoramento da doença (PANTOJA *et al.*, 2017 e PRIYAMVADA *et al.*, 2017). A exposição prévia ao DENV não se correlacionou com pior prognóstico causado por infecção pelo ZIKV durante a gravidez (HALAI *et al.*, 2017).

Assim, a infecção pelo ZIKV em camundongos neonatos, pode ser usada para definir mecanismos de patogênese como uma alternativa ao estudo de camundongos adultos imunocomprometidos. Além disso, a infecção por ZIKV de camundongos selvagens neonatais, nos quais um subgrupo sobrevive, pode permitir a avaliação de sequelas comportamentais e de neurodesenvolvimento em longo prazo associadas à infecção por ZIKV do cérebro em amadurecimento (MORRISON; DIAMOND, 2017).

Além dos modelos de camundongos, outras espécies de pequenos animais imunocompetentes podem ser utilizados para modelar a infecção causada pelo ZIKV, incluindo galinhas e porquinhos-da-índia. A infecção de embriões de frango com o ZIKV resulta em infecção viral do sistema nervoso em desenvolvimento, causando a morte fetal em doses mais altas de desafio viral e um fenótipo semelhante à microcefalia em doses mais baixas, replicando alguns aspectos da doença congênita (GOODFELLOW *et al.*, 2016). Cobaias imunocompetentes infectadas com o ZIKV desenvolveram uma viremia transitória, tiveram RNA viral detectável no sangue total e soro, apresentaram um aumento nos níveis de citocinas e quimiocinas, desenvolveram infecção em vários tecidos e desenvolveram anticorpos neutralizantes (KUMAR, M. *et al.*, 2017).

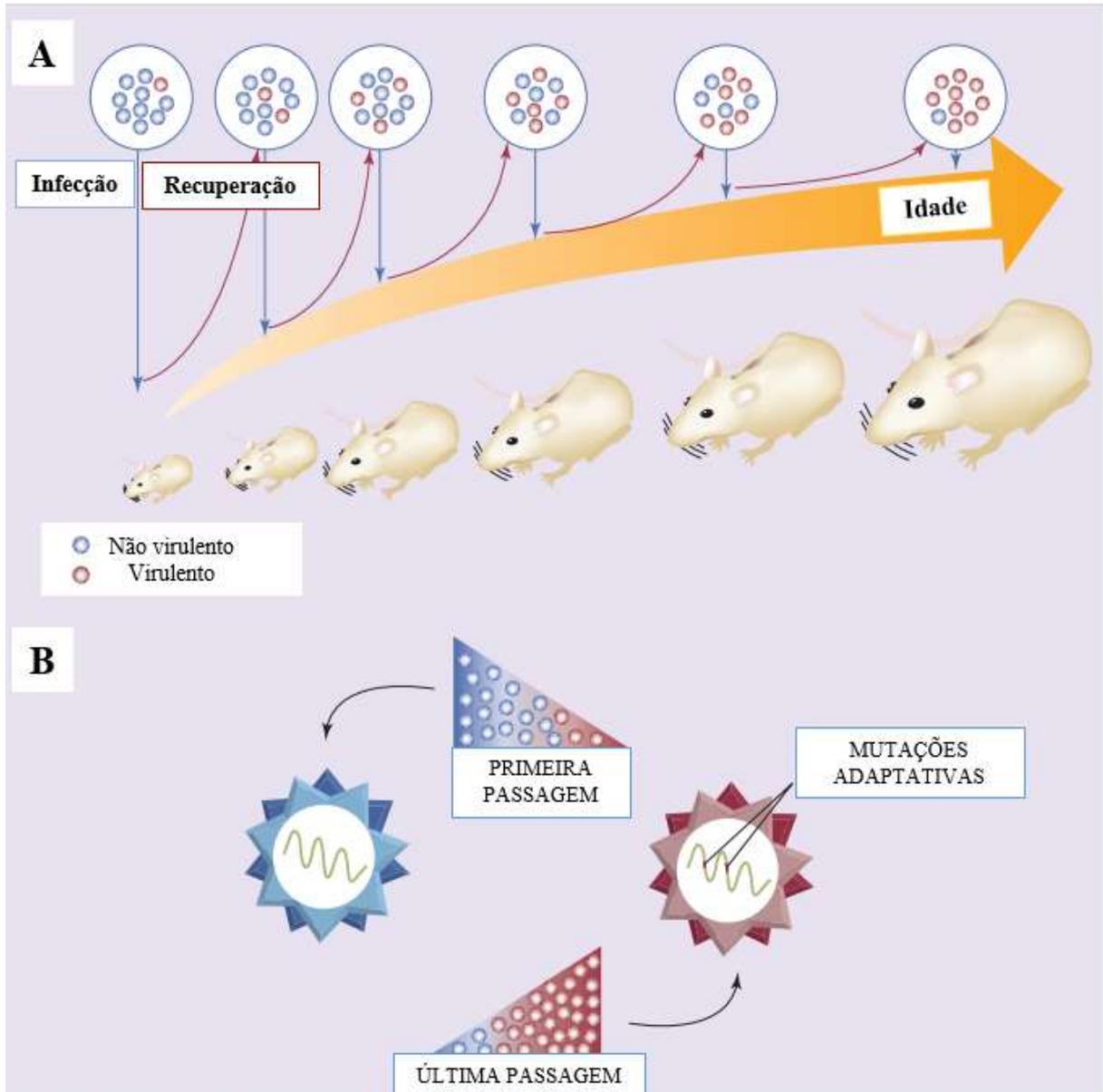
Estes modelos adicionais de infecção e doença podem fornecer sistemas úteis para o avaliação de contramedidas ou na caracterização da doença causada pelo ZIKV (MORRISON; DIAMOND, 2017).

2.9 Passagens seriadas de vírus em camundongos

O método de adaptação de cepas virais em camundongos, visa obter uma cepa capaz de infectar e causar doença ou morte em camundongos imunocompetentes adultos (SARATHY *et al.*, 2015).

O processo de adaptação de cepas virais através de passagens seriadas em camundongos é importante para estudos voltados à patogênese do vírus, bem como para estudos que visam avaliar respostas imunológicas desencadeadas no processo de infecção e em estudos de desenvolvimento de vacinas (AMORIM *et al.*, 2015; BRAY *et al.*, 1999; HOTTA, 1952; SARATHY *et al.*, 2015).

Passagens virais em série promovem uma propagação inicial de mutantes que também são submetidos à seleção e propagação em animais mais velhos até que as variantes selecionadas possam infectar e matar camundongos adultos (AMORIM *et al.*, 2015) (Figura 10).

Figura 10 - Adaptação viral após passagens seriadas em camundongos.

Fonte: Amorim, *et al.* (2015, tradução nossa).

Legenda: A cepa viral é inoculada e recuperada do cérebro de camundongos (A). Este processo é repetido em série (B). Ocorrem seleção e mutações adaptativas durante o processo de adaptação viral ao hospedeiro (C).

A adaptação viral no camundongo é um processo de expansão clonal, com seleção de variantes de vírus individuais com mutações adaptativas selecionadas em uma dada cepa viral (ATRASHEUSKAYA, 2003; BRAY *et al.*, 1998; SABIN *et al.*, 1945).

Sabin em 1945, demonstrou que isolados virais adaptados do DENV obtidos após passagens sequenciais em cérebro de camundongos neonatos, eram capazes de provocar sinais de infecção, como danos no cérebro e nos pulmões, hemorragia e viremia (SABIN; SCHLESINGER, 1945).

O subtipo Zaire do vírus Ebola (EBO-Z) é letal para ratos recém-nascidos, mas os ratos adultos são resistentes, o que impede a sua utilização como um modelo animal de infecção letal pelo Ebola (VAN *et al.*, 1979). Bray *et al.*, 1999, realizou passagens do vírus Ebola (cepa Mayinga, 1976) em camundongos com até 15 dias de idade. A cepa obtida se mostrou letal para camundongos entre 8 e 15 dias de idade das linhagens BALB/c, C57BL / 6 e ICR. Alterações patológicas no fígado e baço de camundongos infectados com a cepa adaptada, assemelharam-se às observadas em infecções com EBO-Z em primatas não humanos (BRAY *et al.*, 1999).

Passagens seriadas também já foram utilizadas para a realização da neuroadaptação do YFV. Neste estudo camundongos da Linhagem Swiss de 35 dias de idade, foram inoculados via intracerebral. Os experimentos mostraram que o caráter neurotrópico do vírus sofreu uma mudança rápida e marcante depois de 17 passagens no cérebro dos camundongos. O neurotropismo aumentou o suficiente para causar uma alta incidência de encefalite nos animais experimentados (MEERS, 1959).

Após a descoberta do ZIKV, estudos iniciais exigiram muitas passagens em série do vírus em camundongos para produzir fenótipos consistentes (DICK *et al.*, 1952). Um estudo clássico realizou passagens seriadas via subcutâneo em camundongos C57BL/6 de 4 a 6 semanas de idade, utilizando a cepa ZIKV Dakar 41525, Senegal, 1984. Posteriormente, a cepa adaptada foi então inoculada em um novo grupo de animais e estes não sucumbiram a doença. Porém, a avaliação de carga viral mostrou que animais que receberam a cepa adaptada apresentavam uma carga de RNA viral maior em diferentes partes do cérebro quando comparado aos animais que receberam a cepa parental (GORMAN *et al.*, 2018).

Todos esses resultados lançaram a base de um modelo experimental para o ZIKV baseado na utilização de camundongos, que mimetizam pelo menos parcialmente, a doença em humanos.

3 JUSTIFICATIVA

A infecção pelo ZIKV está sendo considerada a mais recente ameaça à segurança sanitária no Brasil e no mundo. Além dos sintomas comuns presentes em outras arboviroses, o ZIKV está diretamente relacionado com casos de microcefalia e outras malformações congênitas como calcificações intracranianas, dilatação do sistema ventricular e distúrbios da migração neuronal. Em adultos, complicações neurológicas graves, como mielite, meningoencefalite e síndrome de Guillain-Barré (SGB), têm sido associadas à infecção pelo ZIKV. Diante disso, é essencial que existam mais estudos para entender os mecanismos efetuados pelo vírus e desenvolver mecanismos de proteção ao mesmo, sendo que para isso é essencial o desenvolvimento de modelos animais capazes de auxiliar na condução de novas pesquisas sobre o ZIKV.

Modelos animais adequados podem favorecer na condução de pesquisas com ZIKV. Camundongos com sistema imune intacto, por exemplo, são mais adequados ao teste vacinal quando comparados aos camundongos imunodeficientes A129 e AG129, uma vez que estes podem subestimar a imunogenicidade e eficácia vacinal. Os camundongos da linhagem Swiss são não consanguíneos (*outbred*) e por isso possuem alta variabilidade genética, assim como os seres humanos e diferentemente dos camundongos nocautes.

O desenvolvimento de cepas de neuroadaptadas ou com tropismo para o aparelho genital feminino permitirá o teste de vacinas em animais com o sistema imune hígido e terá um grande impacto para o desenvolvimento de plataformas vacinais frente ao ZIKV. Além disso, a identificação das mutações responsáveis pela adaptação neural ou geniturinária irá contribuir para identificação dos marcadores moleculares de virulência e transmissibilidade do vírus.

4 PERGUNTA CONDUTORA

A realização de passagens seriadas da cepa selvagem do ZIKV via vaginal e intracerebral em camundongos Swiss, resultará cepas neuroadaptadas ou com tropismo para o aparelho genital feminino que permitirão o teste de vacinas em animais com o sistema imune hígido?

5 HIPÓTESE

A passagem seriada do ZIKV em camundongos promoverá os processos de mutação e seleção natural que resultarão em mudanças fenotípicas que favorecerão a sua adaptação neural e geniturinária em camundongos com sistema imune hígido.

6 OBJETIVO GERAL

Adaptar a cepa selvagem do ZIKV para a replicação no sistema nervoso central e no aparelho geniturinário de camundongos (*Mus musculus*).

6.1 Objetivos Específicos

- a) Estabelecer e padronizar a técnica de inoculação intracerebral do ZIKV em camundongos neonatos e adultos;
- b) Adaptar o ZIKV para a replicação no aparelho geniturinário de camundongos da linhagem Swiss;
- c) Caracterizar fenotipicamente os vírus obtidos após passagem seriada em linhagens celulares;
- d) Avaliar a morbidade e mortalidade de camundongos infectados por cepas adaptadas do ZIKV;
- e) Avaliar as alterações anatomopatológicas em camundongos infectados por cepas adaptadas do ZIKV;
- f) Avaliar a carga viral em cérebro e baço de camundongos infectados por cepas adaptadas do ZIKV;

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O presente tópico descreve todos os métodos empregados no decorrer do trabalho. Neste espaço são descritos: modelo animal, considerações éticas, neuroadaptação e adaptação geniturinária viral, células e vírus, extração de RNA, RT-LAMP, anestesia e eutanásia, avaliação histopatológica, titulação viral, sequenciamento e análise estatística.

7.1 Modelo animal

Para a realização dos ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos das linhagens Swiss e A129, fornecidos pelo biotério de criação do Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz Pernambuco.

Camundongos Swiss originaram-se nos EUA a partir de uma colônia de nove camundongos levados a Lausanne, Suíça, em 1926. Consistem em um grupo de animais não consanguíneos (*outbred*) e sistema imune hígido. Estes animais são poligâmicos com duração do estro, de 4-5 dias e gestação de 19 a 20 dias com prole variando entre 10 e 12 filhotes com aproximadamente 1.5g de peso cada animal. Apresentam pelagem branca e possuem extensas variações alélicas. São considerados modelos de estudos com propósitos variados (VALERO-LAPCHIK, V. B. *et al.*, 2017) (Figura 11).

Figura 11 - Camundongo da linhagem Swiss.

Fonte: O autor.

Nota: Camundongos da linhagem Swiss são heterozigotos e possuem o sistema imunológico hígido.

Camundongos da linhagem A129 são animais homozigotos, nocautes para interferon alfa e beta ($IFN\alpha/\beta^{-/-}$) e de pelagem agouti. Assim como os camundongos Swiss, os A129 são animais poligâmicos com duração do estro, de 4-5 dias e gestação de 19 a 20 dias. Entretanto, a prole pode variar entre 08 e 10 filhotes (NICOLE, 2016) (Figura 12).

Esses animais são extremamente susceptíveis a infecções virais, uma vez que apresentam resposta imune comprometida devido à ausência da sinalização dos interferons (MULLER, U. *et al.*, 1994).

Figura 12 - Camundongo da linhagem A129.



Fonte: O autor.

Nota: Camundongos da linhagem A129 são homocigotos, nocautes para interferon alfa e beta ($IFN\alpha/\beta^{-/-}$) e possuem o sistema imunológico hígido.

7.2 Inoculação intracerebral em camundongos adultos e neonatos

Passagens intracerebrais em camundongos necessitam de uma técnica adequada de inoculação, minimizando o desconforto animal, infecções indesejadas e o custo com materiais e equipamentos.

Atualmente há poucos trabalhos publicados descrevendo uma forma adequada de inoculação intracerebral para estudos com o ZIKV, utilizando camundongos como modelo animal. Desta forma, se fez necessário o desenvolvimento de uma técnica refinada de inoculação intracerebral para execução deste trabalho.

Para o desenvolvimento desta técnica foram utilizados 20 neonatos com 1 dia de idade e 20 animais jovens adultos com 21 dias de idade, fêmeas da linhagem Swiss (Quadro 1).

Quadro 1—Informações dos grupos experimentais e controles utilizados no refinamento da técnica de infecção intracerebral pelo ZIKV.

Grupo	N	Idade	Linhagem	Via de Infecção
1	10	1 dia	Swiss	Intracerebral
2 (controle)	10	1 dia	Swiss	Intracerebral
3	10	20 dias	Swiss	Intracerebral
4 (controle)	10	20 dias	Swiss	Intracerebral

Fonte: O autor.

Camundongos adultos foram anestesiados pela via intraperitoneal utilizando a associação de Quetamina e Xilazina, de acordo com o peso corporal (Figura 13).

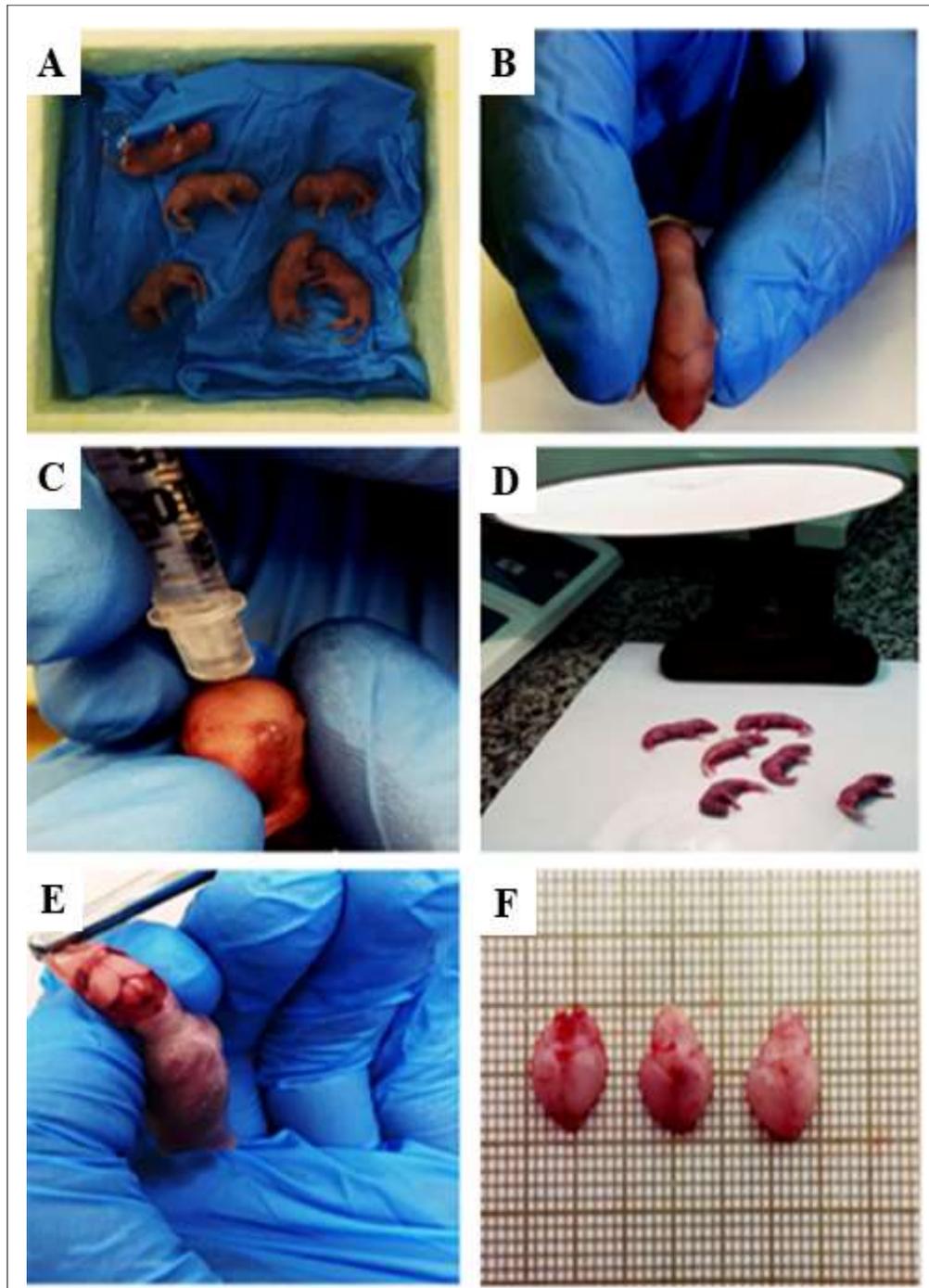
Figura 13 - Anestesia intraperitoneal em camundongo Swiss.



Fonte: O autor.

Nota: A inoculação é realizada no quadrante inferior esquerdo do abdôme.

O protocolo anestésico escolhido para os neonatos foi a indução por hipotermia e para os jovens adultos, a associação de Xilazina e Quetamina. A hipotermia é apropriada para procedimentos curtos (5-15 minutos) em neonatos ou camundongos com até 5 dias de idade. Os roedores muito jovens, são resistentes ao dano cerebral associado à parada circulatória cefálica. O resfriamento superficial é efetivo devido à sua pequena superfície e tamanho corporal. A hipotermia proporciona imobilização e analgesia suave (semelhante à anestesia local, resultando em bloqueio da transmissão nervosa. Os neonatos foram protegidos por luvas látex para evitar contato direto com o gelo, evitando queimaduras. Posteriormente os animais foram acondicionados sob gelo triturado. O tempo de indução anestésica se deu entre 2-4 minutos. Após este período, os animais receberam a antissepsia na região cranial e posteriormente receberam o inóculo de suspensão viral (20µldo ZIKV na concentração $2,15 \times 10^6$ unidades formadoras de placa por mililitro de sobrenadante celular (PFU/ml) com o auxílio de seringa de calibre 6 mm x 0,25 mm na região cranial denominada bregma. Após à inoculação, os animais foram acomodados sob a luz de lâmpada incandescente, para observação até reestabelecimento dos parâmetros fisiológicos (Figura 14).

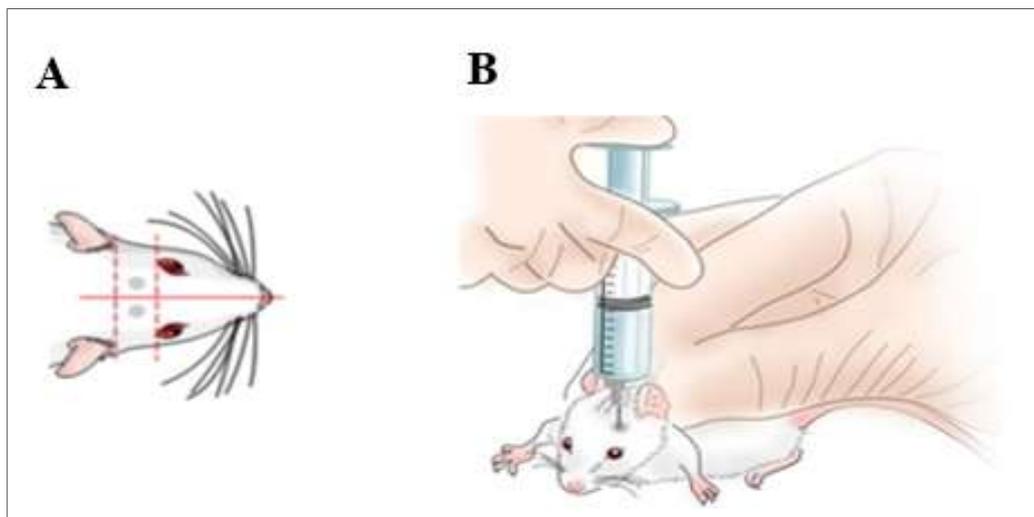
Figura 14 - Inoculação intracerebral em camundongos neonatos.

Fonte: O autor.

Legenda: Anestesia realizada por hipotermia com o auxílio de luva látex para evitar danos a pele dos animais (A). Os animais são inoculados na região cranial em formato de Y denominada bregma (B). A inoculação intracerebral é realizada com o auxílio de seringa de calibre 6 mm x 0,25 mm (C). Pós inoculação os animais recuperam a temperatura corporal com o auxílio de luz incandescente (D). Realiza-se a extração cerebral para avaliação (E). Avaliação morfológica dos cérebros coletados (F).

Os camundongos de 21 dias de idade após serem previamente anestesiados, receberam a antissepsia na região cranial e receberam o inóculo na região temporal, introduzindo a agulha verticalmente acima da linha média, entre o globo ocular e a orelha (Figura 15).

Figura 15 - Inoculação intracerebral em camundongos adultos.



Fonte: O autor.

Legenda: Região temporal (A). Inoculação realizada através da introdução da agulha verticalmente acima da linha média, ente o globo ocular e a orelha (B).

Grupos controles de camundongos neonatos e adultos receberam PBS seguindo o mesmo protocolo de inoculação dos grupos experimentais.

Cinco dias pós-infecção, os animais foram eutanasiados e tiveram o cérebro coletado para avaliação. Para constatação da infecção cerebral, o macerado cerebral foi centrifugado e o sobrenadante foi inoculado em células de linhagem Vero.

7.3 Células e vírus

Células Vero foram cultivadas em meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco – marca Gibco®) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (SFB), 2 ml -glutamina e 100 U ml⁻¹ penicilina / estreptomicina, mantidos à 37 °C com 5% de CO₂.

Em todos os experimentos, foram utilizados a cepa viral denominada vírus Zika/h. sapiens/Brazil/PE243/2015 (GenBank: KX197192.1). Essa cepa foi isolada em 2015 no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE), do Instituto Aggeu Magalhães, através da inoculação do soro de um paciente infectado na linhagem celular de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36 (IGARASHI, 1978). Após o isolamento, o vírus foi passado uma vez nas mesmas células e os estoques virais foram produzidos em células Vero.

Para a produção de um estoque viral, uma amostra do vírus foi inoculada em células Vero e incubada em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 dias até que o efeito citopático fosse observado em quase todo o tapete celular. Após isto, a garrafa de cultura passou por um ciclo de congelamento e descongelamento e a suspensão foi transferida para um tubo

tipo “falcon” e então centrifugada a 4000 rpm/ 10 minutos sob temperatura de refrigeração (4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante – o qual contém as partículas virais – foi aliquoteado em criotubos em um volume de 1ml.

O estoque viral foi titulado através de ensaio de placa. Para tal, células Vero ($1,0 \times 10^5$ células/poço) foram infectadas com diluições seriadas dos estoques virais. Após 1 hora de adsorção em estufa a 37°C e 5% de CO₂, o inóculo foi retirado e então adicionado o meio contendo 1% de metilcelulose em volume final de 2 ml por poço. Após 6 dias de infecção, as placas foram coradas com cristal violeta 3% e o número total de placas foi determinado por contagem a olho nu. Verificou se o título de $2,15 \times 10^6$ unidades formadoras de placa por mililitro de sobrenadante celular (PFU/ml).

Os estoques foram armazenados a -80 °C até o momento do uso na Coleção de Vírus do Departamento de Virologia da Fiocruz/PE.

7.4 Adaptação do vírus Zika em camundongos da linhagem Swiss através de infecção intracerebral e intravaginal

Para as passagens seriadas, foram utilizados 100 camundongos da linhagem Swiss do sexo feminino com 21 dias idade. Os camundongos foram divididos em quatro grupos: (1) adaptação neural (n=40); (2) adaptação geniturinária (n=40); (3) adaptação neural (controle) (n=10); (4) adaptação geniturinária (controle) (n=10) (Quadro 2).

Quadro 2 -Informações dos grupos experimentais e controle dos camundongos utilizados nas passagens cerebrais e vaginais.

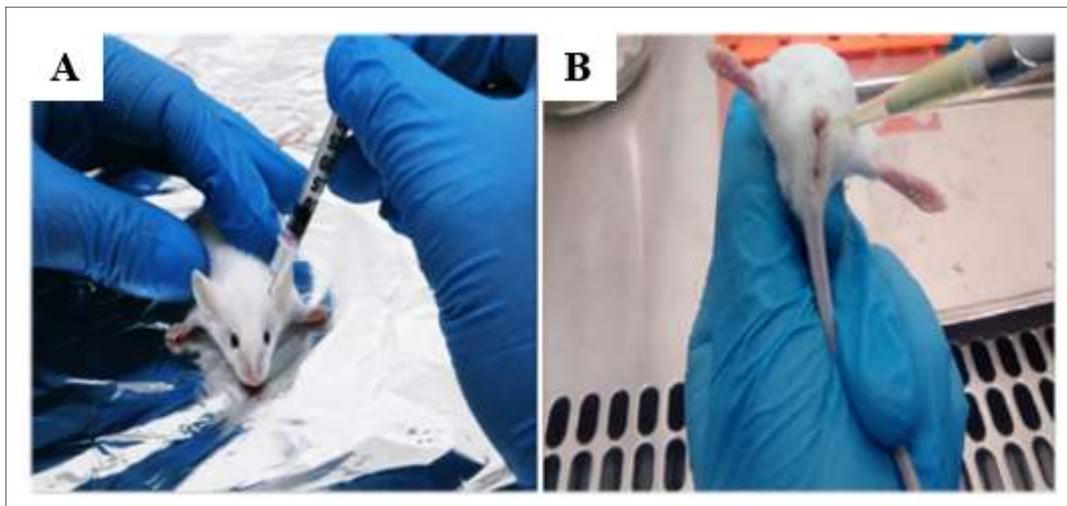
Grupo	N	Linhagem	Via de Infecção
1	40	Swiss	Intracerebral
2	40	Swiss	Intravaginal
3 (Controle)	10	Swiss	Intracerebral
4 (Controle)	10	Swiss	Intravaginal

Fonte: O autor.

Os camundongos foram previamente anestesiados e então inoculados pela via intracerebral ou intravaginal com 20 µl do ZIKV para infecção ou PBS para controle (Figura

16). Foram utilizados 4 animais por passagem no grupo experimental e 1 animal no grupo controle, totalizando 10 passagens.

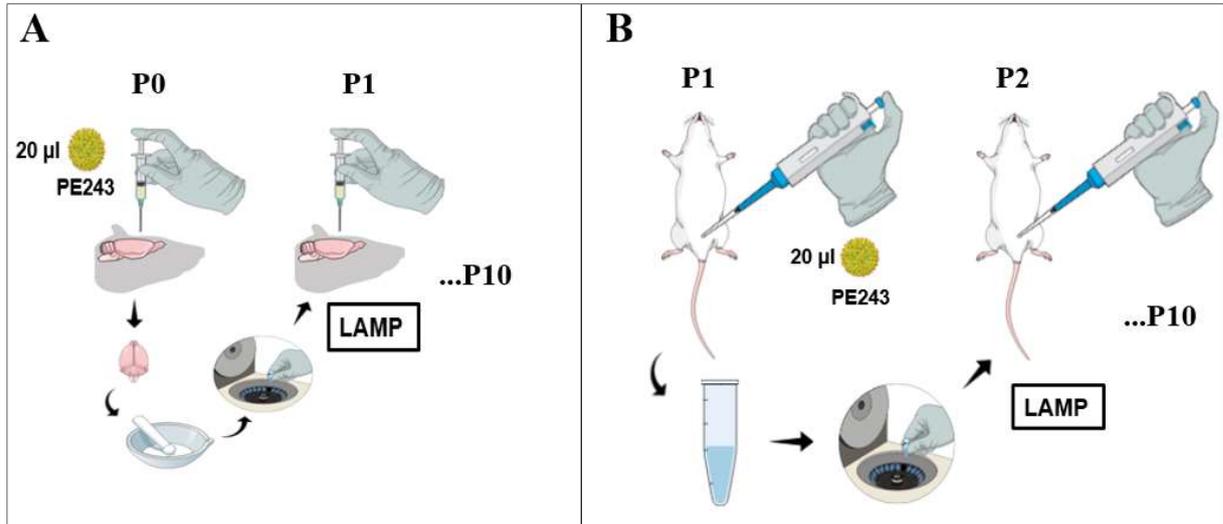
Figura 16 - Inoculação intracerebral e intravaginal em camundongo.



Fonte: O autor

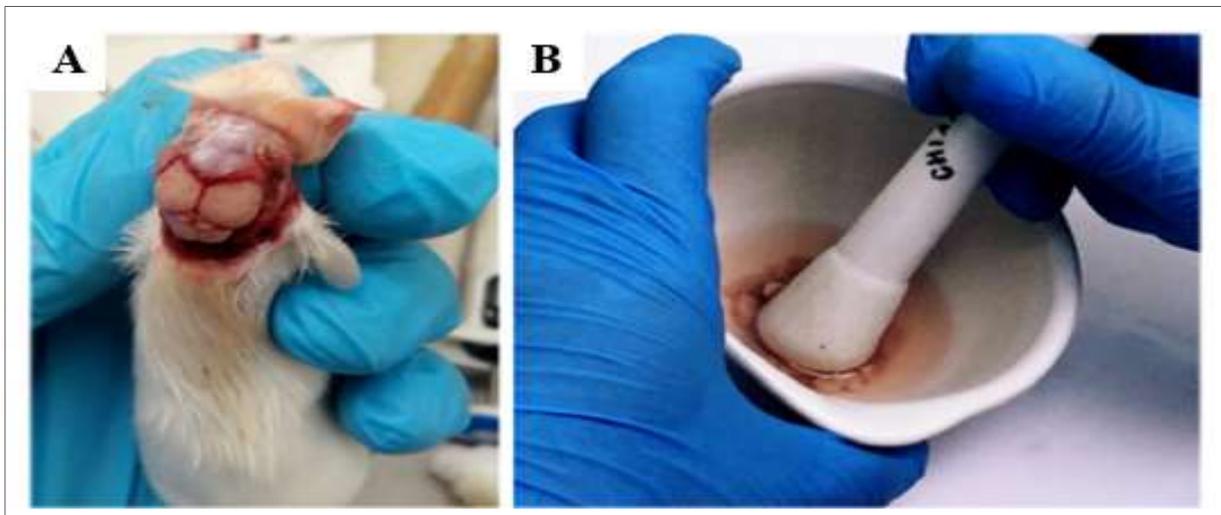
Legenda: Inoculação intracerebral (A). Inoculação intravaginal (B).

A cada três dias, os animais inoculados foram eutanasiados e os cérebros ou lavado vaginal (em 200 μ l de PBS) foram coletados. Os cérebros foram pesados em balança de precisão e tiveram suas medidas aferidas com o auxílio de papel milimetrado, posteriormente foram macerados e centrifugados. O lavado vaginal foi apenas centrifugado. Parte do material coletado e processado foi destinado a reinoculação dos próximos grupos de animais (Figuras 17 e 18).

Figura 17 - Passagens seriadas via intracerebral e intravaginal em camundongos Swiss.

Fonte: O autor.

Legenda: Inoculação do ZIKV via intracerebral em camundongos. Três dias pós inoculação o cérebro é coletado, macerado e centrifugado. Parte do material processado é destinado a realização do teste LAMP para detectar a presença do vírus e outra parte é reinoculada em um novo grupo de animais (A). Inoculação intravaginal do ZIKV em camundongos Swiss. Três dias pós infecção o lavado vaginal foi coletado e centrifugado e reinoculado em um novo grupo de animais. Parte do material processado é destinado a realização do teste LAMP para detectar a presença do vírus e outra parte é reinoculada em um novo grupo de animais (B).

Figura 18 - Processamento dos cérebros infectados pelo ZIKV

Fonte: O autor

Legenda: Extração cerebral (A). Maceração do cérebro (B).

Durante as passagens parte do material coletado também foi destinado a realização da técnica de RT-LAMP (Transcrição reversa seguida de amplificação isotérmica mediada por alça) para a confirmação da infecção dos animais inoculados. Por fim, o restante do material foi congelado a -80°C .

7.5 RT-LAMP

As reações de RT-LAMP foram realizadas em triplicata em um volume total de 25 μ L contendo 1x Tampão de Amplificação Isotérmica, 8 mM MgSO₄, 4 U de Bst DNA polimerase [versão 3.0 WarmStart; New England Biolabs (NEB)], trifosfatos de desoxinucleotídeos 1,8 mM (dNTPs) (ThermoFisher Scientific), 1.6 μ M de FIP, 1.6 μ M de BIP, 0.2 μ M de F3, 0.2 μ M de B3, 0.4 μ M de LF, 0.4 μ M de LB e 5 μ L de amostra (controle sem molde (NTC), RNA extraído ou amostras sem extração de RNA). Estes primers foram descritos previamente e se anelam na região genômica que corresponde a proteína E do ZIKV (SONG et al., 2016) (Quadro 3). A fim de visualizar as reações positivas e evitar possíveis problemas de contaminação, 1 μ L de SYBR Green I (ThermoFisher Scientific) diluído em água livre de RNase (Promega) na proporção de 1:10 foi adicionado no centro das tampas do tubo de reação antes do período de incubação. Após o término do tempo de incubação, o SYBR contido na tampa do tubo foi misturado com a amostra. As reações foram incubadas a 72°C durante 20 minutos em um termobloco e em seguida foram inativadas a 80°C durante 5 minutos. Para avaliar a performance do ensaio para aplicações POC, todo o estabelecimento e execução de reações do RT-LAMP foram realizadas em uma bancada de laboratório convencional utilizando pipetas e ponteiros com filtro designadas. O registro e a análise das imagens ocorreram em salas separadas e todos os experimentos foram replicados de forma independente pelo menos três vezes. Após a incubação, as reações dos produtos RT-LAMP foram detectadas usando três métodos diferentes. No primeiro método, os produtos foram observados através do olho nu sob luz natural e fotografados usando uma câmera convencional de celular (iPhone, Apple). Uma mudança de cor de laranja para amarelo esverdeado foi usada para identificar a amostra positiva, enquanto uma amostra negativa permaneceu laranja. O segundo método foi realizado através da análise visual dos tubos de reação sob irradiação com luz ultravioleta (UV), utilizando um transiluminador (modelo UVB LTB 20 \times 20 STV, Locus Biotecnologia, São Paulo, Brasil) acoplado a uma câmera e conectado a um computador. Nesse método, as amostras negativas foram azuis escuras e as reações positivas foram fluorescentes. No terceiro método, os amplicons do RT-LAMP foram analisados por eletroforese em gel de agarose (2,0%) em tampão TAE 1x, seguido de coloração com brometo de etídio e visualização do gel com auxílio do transiluminador. Para a análise por eletroforese, utilizou-se o DNA Ladder de 1 kb Plus (ThermoFisher Scientific) como marcador de peso molecular do DNA.

Quadro 3– Primers utilizados nos ensaios de RT-LAMP

Primer	Sequência (5'-3')	Referência
FIPs	GGCGACATTTCAAGTGGCCAGAGAGCTCTRGAGGCTGAGA	Song <i>et al.</i> , 2016
BIPs	AGGGCGTGTGCATACTCCTTGTGAGTGTTTCAGCCGGGATCT	Song <i>et al.</i> , 2016
F3s	CAGTTCACACGGCCCTTG	Song <i>et al.</i> , 2016
B3s	TGTACCTCCACTGTGACTGT	Song <i>et al.</i> , 2016
LFs	CCTTCCCTTTGCACCATCCA	Song <i>et al.</i> , 2016
LBs	TACCGCAGCGTTCACATTCA	Song <i>et al.</i> , 2016

Fonte: O autor

7.6 Adaptação do vírus Zika em camundongos da linhagem A129 através de infecção intracerebral

Para o ensaio de adaptação cerebral do vírus Zika em camundongos da linhagem A129, foram utilizados 44 animais do sexo feminino com 21 dias de idade.

Os camundongos foram previamente anestesiados e então inoculados pela via intracerebral com 20 µl do ZIKV para infecção ou PBS para controle. Foram utilizados 3 animais por passagem no grupo experimental e 1 animal no grupo controle, totalizando 10 passagens (P10) (Quadro 4).

Quadro 4– Informações sobre os animais nocautes utilizados nas passagens seriadas do ZIKV.

Passagem	N		Linhagem	Via de Infecção
	Experimental	Controle		
0	3	1	A129	Intracerebral
1	3	1	A129	Intracerebral
2	3	1	A129	Intracerebral
3	3	1	A129	Intracerebral
4	3	1	A129	Intracerebral
5	3	1	A129	Intracerebral
6	3	1	A129	Intracerebral
7	3	1	A129	Intracerebral
8	3	1	A129	Intracerebral
9	3	1	A129	Intracerebral
10	3	1	A129	Intracerebral

Fonte: O autor

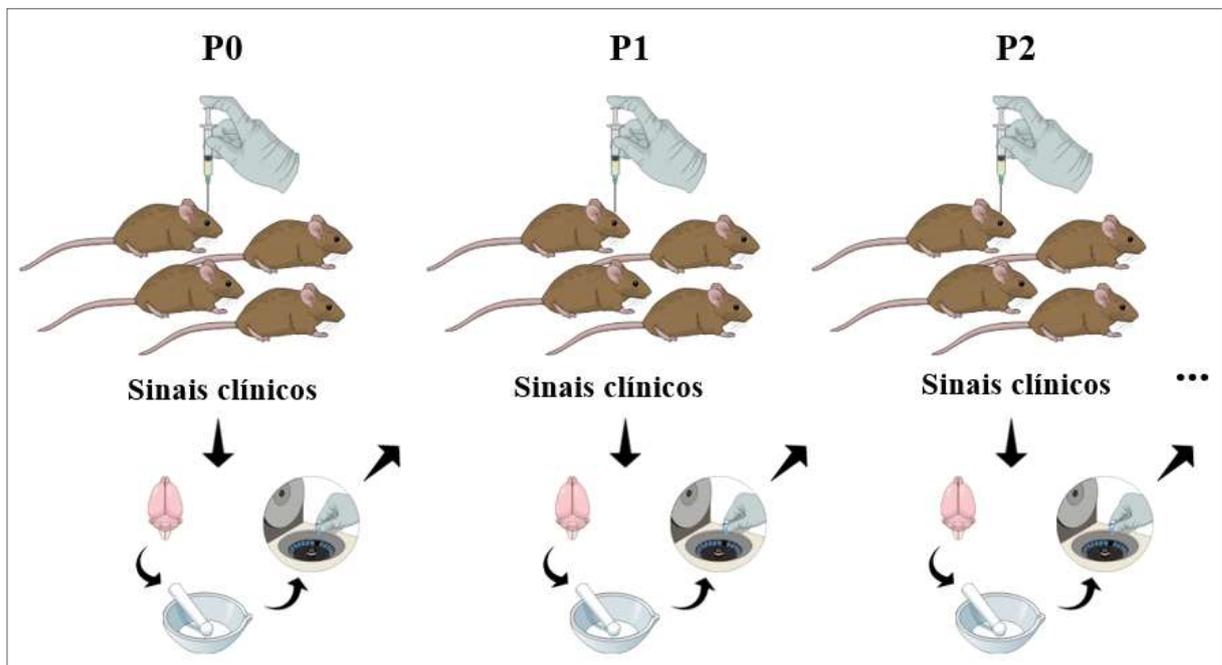
Após inoculados, os animais foram acompanhados diariamente e uma vez constatado sinais clínicos da infecção estes foram eutanasiados e tiveram os cérebros coletados. Os cérebros foram macerados, centrifugados e então o sobrenadante foi reinoculado no próximo grupo de animais. Parte do material processado foi congelado a -80°C (Figura 19).

Após a realização de todas as passagens cerebrais, foram realizados ensaios de placa para verificar a titulação e alteração de fenótipo do vírus passado em camundongos nas passagens 7 e 10. Para tal, células Vero ($1,0 \times 10^5$ células/poço) foram infectadas com diluições seriadas dos estoques virais. Após 1 hora de adsorção em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , o inóculo foi retirado e então adicionado o meio contendo 1% de metilcelulose em volume final de 2 ml por poço. Após 6 dias de infecção, as placas foram coradas com cristal violeta 3% e o número

total de placas foi determinado por contagem a olho nu. Verificou-se o título de $1,3 \times 10^3$ unidades formadoras de placa por mililitro de sobrenadante celular (PFU/ml) para a passagem 7. Já a passagem 10 não houve formação de placas.

Os estoques virais foram armazenados a -80°C até o momento do uso na Coleção de Vírus do Departamento de Virologia da Fiocruz/PE.

Figura 19 - Passagens seriadas via intracerebral e intravaginal em camundongos A129.



Fonte: O autor.

Legenda: Inoculação do ZIKV via intracerebral em camundongos. Após a manifestação de sinais clínicos da doença o cérebro é coletado, macerado e centrifugado. Parte do material processado é reinoculado em um novo grupo de animais.

7.7 Caracterização das cepas adaptadas em camundongos com sistema imunológico intacto

O ensaio de passagens do vírus Zika em camundongos da linhagem Swiss demonstrou que estes camundongos uma vez inoculados tanto pela via intracerebral quanto pela via vaginal não sucumbem a infecção em nenhuma das 10 passagens seriadas e, portanto, não apresentam os fenótipos esperados da doença. Sendo assim o ensaio de caracterização da cepa adaptada do vírus Zika em camundongos imunocompetentes se deu utilizando apenas a cepa obtida das passagens intracerebrais dos camundongos nocautes (A129).

Para caracterizar a virulência da cepa adaptada, a estirpe PE243 (parental) e a cepa obtida da passagem 7 (P7) em camundongos A129, foi inoculada em camundongos da linhagem Swiss.

A cepa obtida da adaptação neural em camundongos e a cepa PE243 foi inoculada em um grupo de 44 camundongos fêmeas, com 21 dias de idade pela via intracerebral. Um grupo controle (n=16) recebeu PBS pela mesma via de inoculação (Quadro 5).

Quadro 5 - Informações dos grupos experimentais e controle e via de infecção dos camundongos utilizados na caracterização da cepa viral obtida (P10) da adaptação cerebral em camundongos A129.

Grupo	N	Linhagem	Via de Infecção
P10	22	Swiss	Intracerebral
PE243	22	Swiss	Intracerebral
Controle – PBS	16	Swiss	Intracerebral

Fonte: O autor

Três, seis e nove dias pós-inoculação, foram selecionados quatro animais de cada grupo para serem eutanasiados e necropsiados para coleta de órgãos (cérebro e baço) para a virologia e exames histopatológicos. No grupo controle dois animais foram eutanasiados nos mesmos dias pós infecção. Os demais animais foram acompanhados diariamente por 21 dias para avaliação da morbidade e mortalidade através de parâmetros clínicos e fisiológicos. Os sinais clínicos terão um valor numérico atribuído a um grupo de sintomas conforme descrito: 1. saudáveis, 2. perda de peso, 3. leves sinais de letargia, 4. leves sinais de letargia, pelos eriçados e postura curvada, 5. letargia aumentada, mobilidade limitada, pelos eriçados e postura curvada, 6. moribundo com mobilidade mínima e incapacidade de comer ou beber água.

7.8 Anestesia e eutanásia

Os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina (respectivamente 100 mg e 10 mg/kg, em solução salina 0.9%), por via intraperitoneal. Ao fim do experimento, os camundongos foram sedados como descrito acima e então submetidos à eutanásia com Tiopental 150mg/kg via intraperitoneal com o uso de lidocaína local, uma vez que os barbitúricos apresentam propriedades irritantes ao peritônio, podendo provocar desconforto aos animais.

7.9 Considerações éticas

Todos os estudos *in vivo* propostos seguiram estritamente as normas vigentes estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz/PE e cumpriram todas as exigências da “Lei Arouca” (Lei 11.794, de 08.10.2008). Protocolo aprovado: CEUA 124/2017.

7.10 Avaliação histopatológica

O exame histopatológico será realizado em secções do cérebro e baço dos animais infectados.

Os órgãos foram fixados em formol 10% e processados segundo a técnica de inclusão em parafina. As amostras fixadas serão desidratadas com concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Posteriormente, serão realizados 3 banhos em parafina, e inclusão das amostras nos blocos de parafina. Os blocos de parafina contendo as amostras serão seccionados a 6 µm com o auxílio de um micrótomo. Para a coloração, os cortes serão desparafinizados em xilol e reidratados com concentrações decrescentes de álcool, corados com hematoxilina e, posteriormente, com eosina (HE). As lâminas serão montadas e as alterações histopatológicas serão visualizadas com o auxílio de um microscópio óptico (PENA, VINCENT *et al.* 2008).

7.11 Titulação viral

Parte do cérebro e baço coletados serão acondicionados em MEM 5X (acrescidos de dose 5 vezes maior de antibiótico) e, posteriormente, macerados e centrifugados a 3000rpm por 10 minutos. O sobrenadante será coletado e inoculado em células Vero, cultivadas em placas de 24 poços. As células inoculadas serão monitoradas diariamente em busca de efeito citopático. Após 72 horas, as células serão congeladas e descongeladas duas vezes e reinoculadas em monocamadas semi-confluentes para posterior titulação.

7.12 Sequenciamento

A caracterização genética das cepas obtidas a partir de passagens seriadas em cérebro de camundongos foi realizada pelo método de Sanger. Os fragmentos foram diretamente purificados utilizando o Illustra GFX PCR DNA e o Kit de Purificação de Banda em Gel de acordo com as instruções do fabricante e posteriormente eluídos em 30 µL de água. Os produtos purificados foram sequenciados usando o primer FIP e o kit de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA) conforme estabelecido pelo fabricante e

executado em um sequenciador automático (ABI Prism 3100 CapillaryAutomatic DNA Analyzer). As sequências de fragmentos serão analisadas usando o software Bioedit, v7.0.5 e submetidas ao banco de dados NCBI - BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

7.13 Análise estatística

Os gráficos foram gerados através o software GraphPadPrism (ANOVA) versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA) utilizando dados do tamanho de placas e do peso dos cérebros de camundongos experimentalmente infectados pelo ZIKV.

8 RESULTADOS

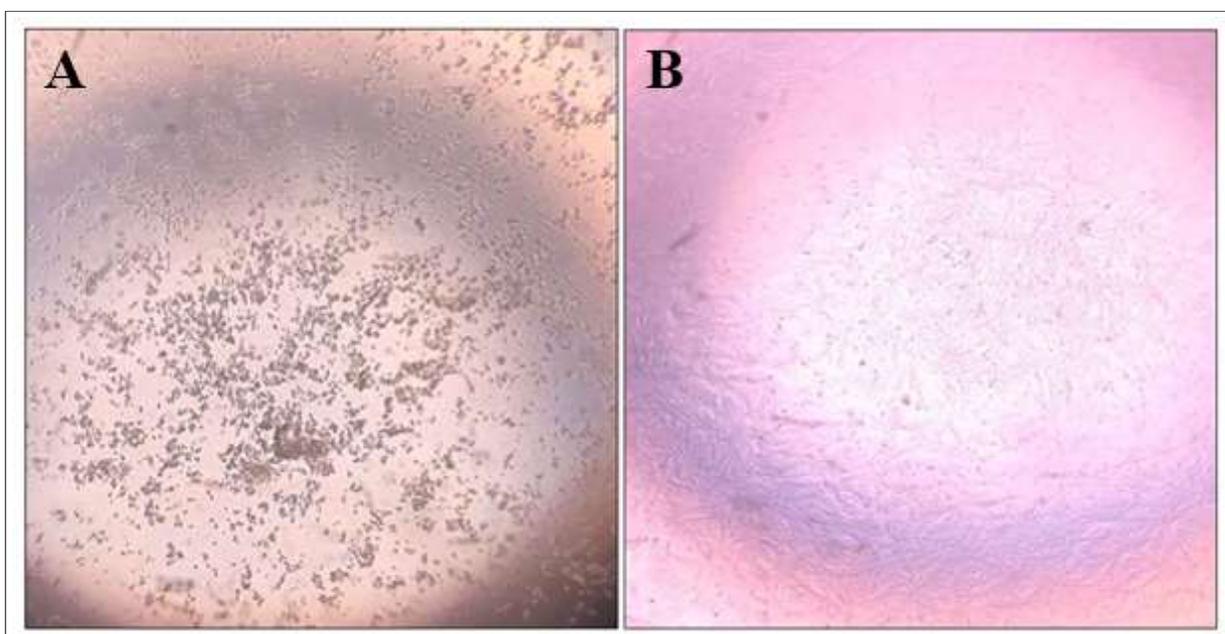
O presente tópico apresenta todos os resultados obtidos da execução deste estudo.

8.1 Camundongos neonatos e jovens adultos da linhagem Swiss podem ser infectados intracerebralmente com o vírus Zika

Camundongos neonatos e adultos foram utilizados para o desenvolvimento de uma técnica de inoculação intracerebral eficaz favorecendo os estudos de neuropatogênese causado pelo ZIKV.

Neonatos com 1 dia de idade e animais com 21 dias de idade, fêmeas da linhagem Swiss, infectados com a cepa ZIKV PE243 via intracerebral foram eutanasiados no quinto dia pós infecção e tiveram o cérebro coletado para avaliação. Para constatação da infecção cerebral foram realizadas as inoculações do macerado cerebral em células de linhagem Vero, onde foi possível comprovar a presença viral no sétimo dia pós infecção através da observação do efeito citopático (Figura 20).

Figura 20 - Células da linhagem Vero.



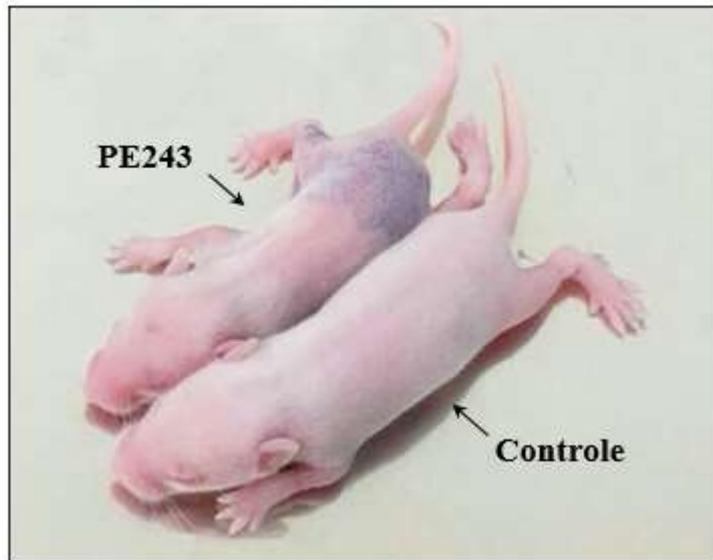
Fonte: O autor.

Legenda: Efeito citopático causado pelo ZIKV PE243 sete dias pós infecção (A). Controle (B).

Durante os cinco dias pós infecção os camundongos neonatos apresentaram sinais clínicos da doença como letargia, tremores, perda de equilíbrio e movimentos de pedalagem

(Figura 22). Também se observou que neonatos infectados pelo ZIKV apresentaram perda de peso e um comprometimento do desenvolvimento do tamanho corporal (Figura 21).

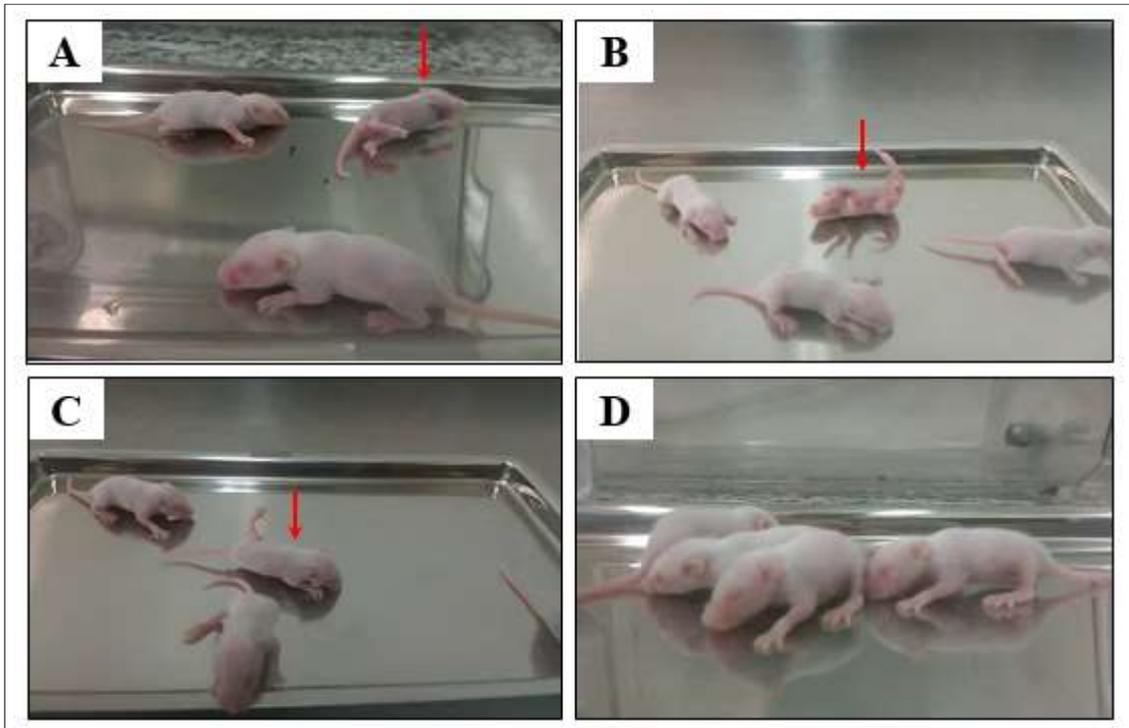
Figura 21 - Comparação do tamanho corporal de camundongos neonatos da linhagem Swiss experimentalmente infectados com o ZIKV.



Fonte: O autor.

Legenda: O camundongo infectado com o ZIKV apresenta menor tamanho corporal quando comparado ao controle.

Figura 22 - Neonatos Swiss infectados com ZIKV.



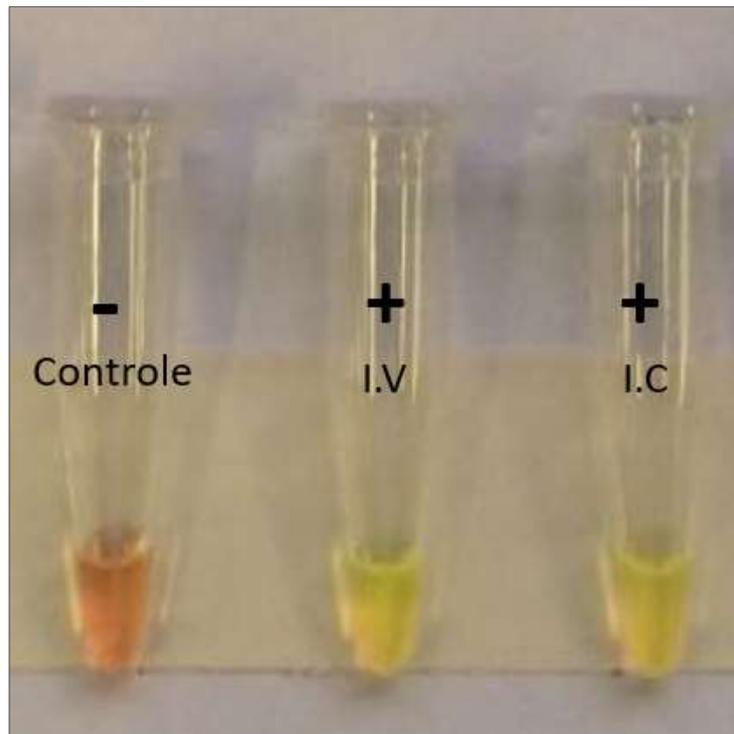
Fonte: O autor.

Legenda: Incoordenação motora (A). Movimento de pedalagem (B). Paralisia de membros (C). Controle (D).

8.2 O vírus Zika pode ser detectado entre passagens intracerebrais e intravaginais seriadas em camundongos Swiss

Amostras do macerado cerebral e lavado vaginal coletados dos camundongos Swiss, fêmeas de 21 dias de idade e avaliadas por RT-LAMP, foram positivas para a presença do ZIKV (Figura 23).

Figura 23 - Resultado da análise obtida por RT-LAMP.



Fonte: O autor.

Legenda: As amostras do cérebro e do lavado vaginal se encontravam positivas para a presença viral. As amostras referem se a passagem de número 4.

Os animais inoculados via intracerebral nas passagens 4, 8 e 10, tiveram além do cérebro coletado, também o lavado vaginal. O mesmo foi realizado nos animais inoculados via intravaginal, neste caso além do lavado vaginal, os animais também tiveram o cérebro coletado. Observou-se que camundongos que receberam a cepa viral via intracerebral na passagem 4 (P4) também foram positivos para a presença do vírus no lavado vaginal. Na passagem 8 (P8) o contrário foi observado. Animais inoculados via intravaginal também foram positivos para a presença do vírus no cérebro. Por fim, na passagem 10 (P10) apenas os animais inoculados via intravaginal estavam positivos, o que não ocorreu nas amostras cerebrais (Quadro 6).

Quadro 6 - Resultados obtidos através da técnica RT-LAMP para a constatação viral entre as passagens cerebrais e vaginais de camundongos.

Passagem	Controle	Cérebro	Lavado vaginal
P1	-	+	+
P2	-	+	+
P3	-	+	+
P4 (intravaginal)	-	-	+
P4 (intracerebral)	-	+	+
P5	-	+	+
P6	-	+	+
P7	-	+	+
P8 (intravaginal)	-	+	+
P8 (intracerebral)	-	+	-
P9	-	+	+
P10 (intravaginal)	-	-	+
P10 (intracerebral)	-	-	-

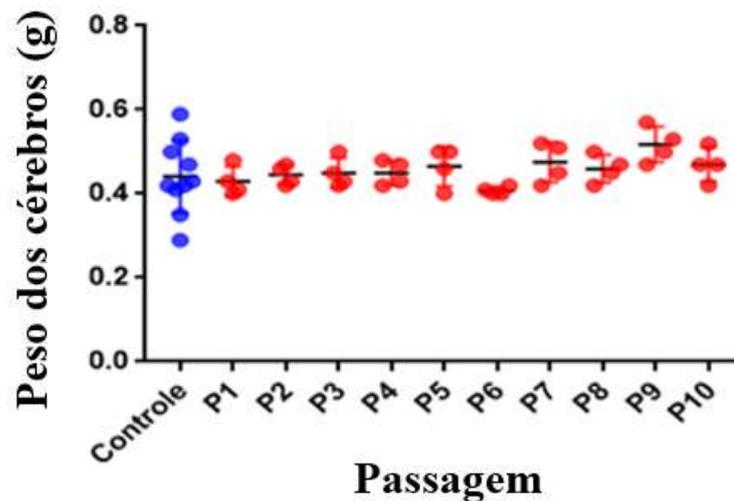
Fonte: O autor.

8.3 Camundongos Swiss infectados com o vírus Zika não apresentam diminuição de tamanho e peso do cérebro e não apresentam sinais clínicos da doença

Durante as passagens seriadas os cérebros coletados foram avaliados morfológicamente utilizando os parâmetros de tamanho e peso.

As análises demonstraram que camundongos infectados via intracerebral com a cepa ZIKV PE243 não tiveram influencias no peso cerebral quando comparados ao grupo controle (Figura 24).

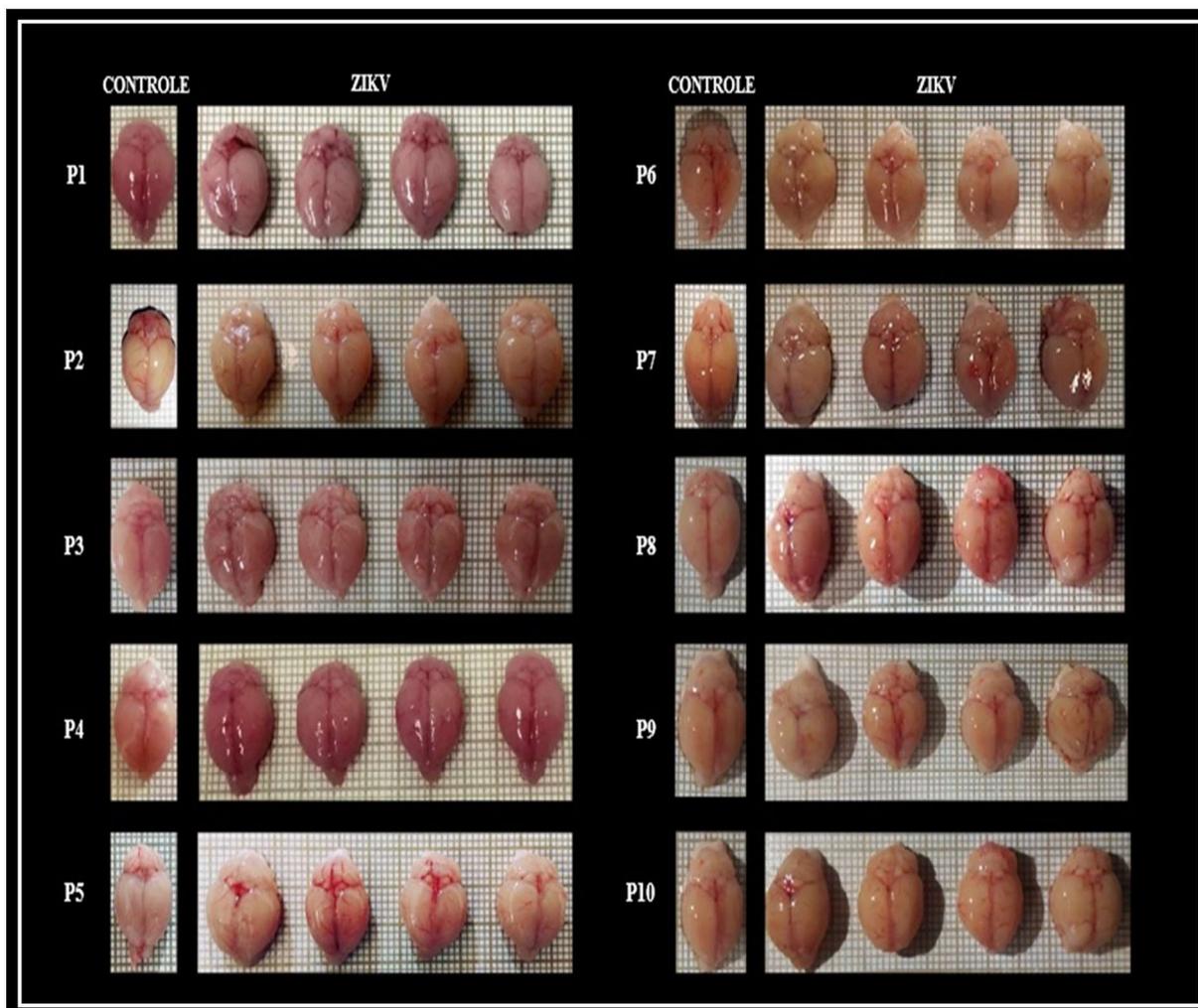
Figura 24 - Gráfico comparativo entre o peso dos cérebros dos animais infectados durante as passagens seriadas comparados aos grupos controle.



Fonte: O autor.

Legenda: Os cérebros dos camundongos experimentalmente infectados pelo ZIKV (círculos vermelhos) apresentaram peso médio entre 0,4 a 0,6 gramas igualmente aos observados no grupo controle (círculos azuis).

Também não se constatou diferenças observáveis no tamanho dos cérebros de camundongos infectados pelo vírus (Figura 25).

Figura 25 - Avaliação morfológica dos cérebros inoculados com o vírus Zika.

Fonte: O autor:

Legenda: Não houveram diferenças observáveis entre a anatomia dos cérebros inoculados quando comparados ao controle e entre as passagens seriadas.

Deve se ressaltar que nenhum animal inoculado via intracerebral ou intravaginal apresentou sinais clínicos da infecção pelo ZIKV no decorrer dos experimentos.

8.4 Camundongos A129 inoculados via intracerebral com o ZIKV apresentam sinais clínicos da doença

Camundongos da linhagem A129 inoculados pela via intracerebral com a cepa PE243 do ZIKV apresentaram sinais clínicos da doença durante a realização do ensaio de neuroadaptação.

Três animais do grupo P0 apresentaram pelos eriçados, perda de peso e postura de lordose, nove dias pós infecção inicial com o ZIKV (Figura 26).

Figura 26 - Camundongo A129 em posição de lordose com pelos eriçados.

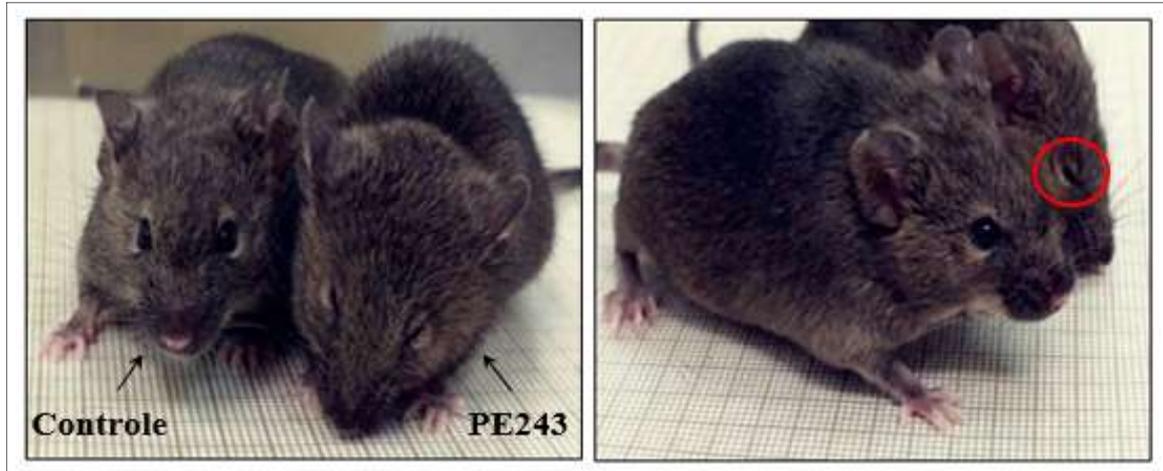


Fonte: O autor.

Legenda: O camundongo apresenta um arqueamento da coluna e os pelos eriçados. Os sinais foram observados 9 dias pós infecção.

Com 8 dias pós infecção, observou-se que três animais do grupo P1 sucumbiram a doença. Estes animais apresentaram conjuntivite, além de lordose e perda de peso. Dois destes animais apresentaram conjuntivite do tipo não purulenta enquanto o terceiro animal apresentou conjuntivite purulenta (Figura 27).

Figura 27 - Camundongos A129 com conjuntivite comparados ao controle.

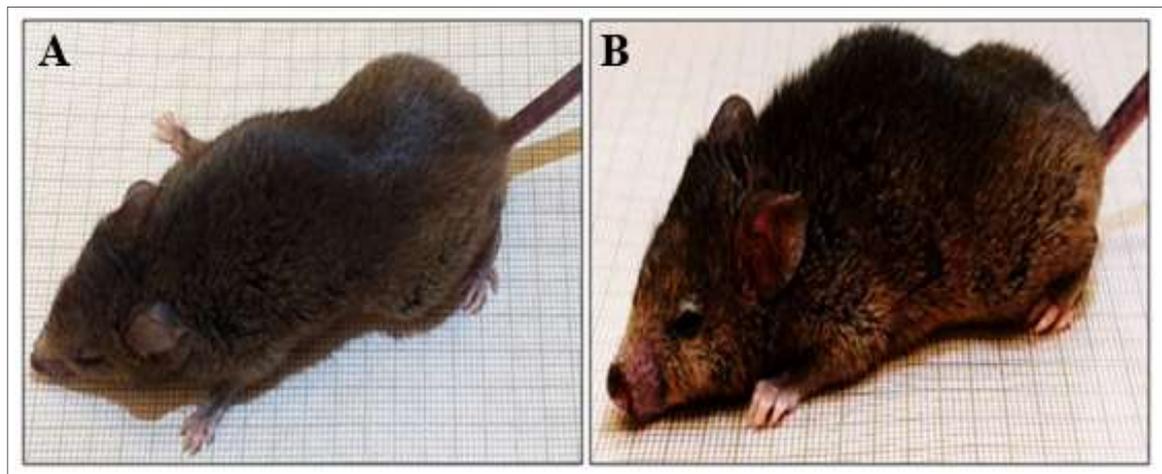


Fonte: O autor.

Legenda: O camundongo infectado com a cepa PE243 do ZIKV apresenta um quadro de conjuntivite não purulenta.

Na segunda passagem do vírus (P2), todos os animais inoculados do grupo experimental (3 camundongos), além dos sinais observados nas passagens anteriores, também manifestaram letargia leve a moderada no oitavo dia pós infecção. Na sequência (P3), dois animais apresentaram paralisia parcial (paresia) e um animal apresentou paralisia total dos membros anteriores e posteriores (Figura 28).

Figura 28 - Camundongo A129 com paralisia de membros.



Fonte: O autor

Legenda: Paralisia parcial (membros anteriores) (A). Paralisia total dos membros (B).

A partir da passagem 4 (P4), os animais continuaram a apresentar perda de peso, pelos eriçados, posição de lordose e conjuntivite purulenta. Além desses sinais, os animais se manifestaram letárgicos, o que desencadeou ao estado de estupor, em que os animais só

demonstravam reações quando estimulados. Nesta passagem, dois animais sucumbiram a doença, o que ocorreu sete dias pós infecção. Ainda na quarta passagem do vírus Zika, foi possível observar uma evolução do quadro da doença que levou ao comprometimento de funções neurológicas.

Nas passagens seguintes (P5, P6, P7), os animais apresentaram sinais neurológicos graves causados pela infecção. Foram observados tremores, inclinação da cabeça, incoordenação motora, movimentos de pedalagem e marcha em círculos. Todas as complicações observadas se deram entre o quinto e sexto dia pós infecção. Além dos sinais neurológicos, foram observadas outras complicações causadas pelo vírus nos camundongos infectados nestas passagens (Figura 29).

Figura 29 - Movimento de pedalagem.



Fonte: O autor.

Legenda: O camundongo infectado perde a capacidade de se manter de pé e realiza movimentos de pedalagem com os membros.

A partir da quinta passagem, todos os animais infectados também passaram a apresentar edema e congestão passiva nos membros posteriores (Figura 30). Essa característica se manteve até a sétima passagem viral (P7).

Figura 30 - Edema e congestão passiva em membro posterior de camundongo A129 infectado pelo ZIKV.

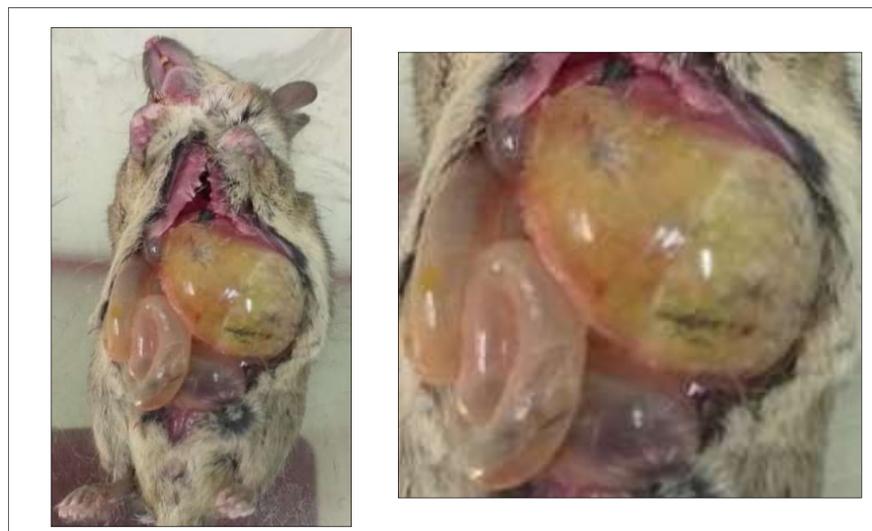


Fonte: O autor.

Legenda: Camundongo com membro posterior esquerdo em processo inflamatório causado pela infecção do ZIKV.

Um camundongo inoculado na quinta passagem apresentou distensão abdominal no sexto dia pós infecção. Este animal foi eutanasiado e submetido a necropsia. Observou-se que o animal apresentava timpanismo gastrointestinal (Figura 31).

Figura 31 - Timpanismo gastrointestinal. Formação de gases no trato digestivo.



Fonte: O autor.

Legenda: Camundongo com o sistema digestório dilatado e presença de gases.

Camundongos inoculados nas passagens 4,5,6 e 7 também apresentaram bexiga atônica ou arreflexa (Figura 32).

Figura 32 - Bexiga atônica ou arreflexa.



Fonte: O autor.

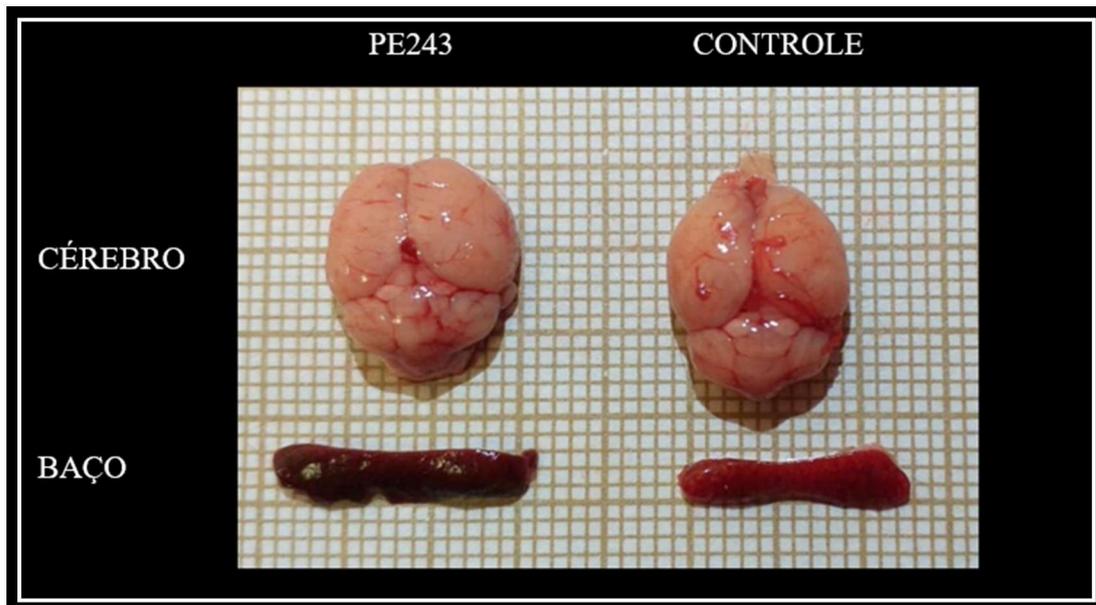
Legenda: O camundongo apresenta a bexiga urinária aumentada e incapacidade de desprezar a urina.

Excepcionalmente na passagem sete (P7), um animal sucumbiu à doença com dois dias pós infecção. Esse animal apresentou além de perda de peso, comportamento de marcha em círculos. Porém, geralmente a marcha em círculos é observada em movimentos relativamente lentos. Neste caso, observou-se que o animal infectado realizava a marcha em círculos rapidamente (movimento de corrida). Após apresentar esse fenótipo, o animal veio a óbito. Uma necropsia foi realizada e foram coletados o baço e o cérebro do camundongo infectado.

Observou-se que o baço do animal infectado estava aumentado o que caracteriza esplenomegalia. Também verificou se que o baço apresentava coloração mais escura quando comparado ao controle. Neste órgão também foi constatado a presença de um ponto esbranquiçado medindo aproximadamente 1mm², sugerindo a ocorrência de uma necrose esplênica (Figura 33).

Quando avaliado o cérebro do animal infectado, observou-se que este apresentava se edemaciado o que não foi constatado no controle (Figura 33).

Figura 33 - Comparação entre o cérebro e o baço de um camundongo A129 infectado com ZIKV comparado ao controle.



Fonte: O autor.

Legenda: O cérebro do animal infectado apresenta-se edemaciado e o baço com coloração escura e com tamanho aumentado.

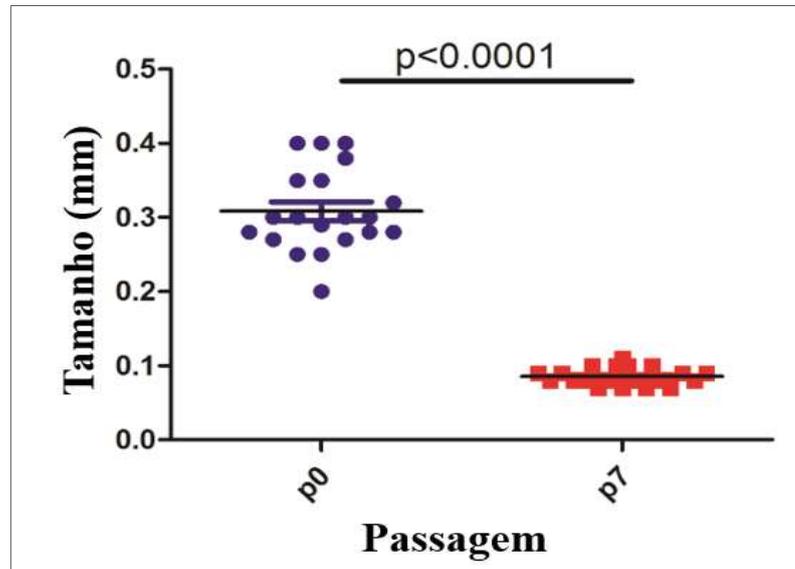
Os animais inoculados nas passagens oito, nove e dez (P8, P9 e P10) não manifestaram sinais clínicos evidentes da doença. Todos estes tiveram o cérebro coletado no quinto dia pós infecção para a recuperação e reinoculação do vírus em um novo grupo de animais.

8.5 Passagens seriadas do Zika em cérebros de camundongos alteram o fenótipo do vírus

Após as passagens seriadas em camundongos da linhagem A129, realizou-se o ensaio de placas utilizando os vírus recuperados dos cérebros dos camundongos infectados na sétima e décima passagem. Embora não constatou-se manifestações neurológicas nos animais a partir da oitava passagem, optou-se em verificar o efeito citopático apresentado pelo vírus na décima passagem.

O ensaio de placa mostrou que na passagem sete (P7) o vírus apresentou formação de placas em tamanhos menores (~ 1 mm), diferentemente do observado no ensaio realizado com o vírus parental (P0) que apresentou placas maiores (~ 3 mm). (Figura 34)

Figura 34 - Tamanhos de placas observados no ensaio utilizando a cepa parental do ZIKV comparado ao ensaio utilizando a cepa recuperada na passagem 7 do cérebro de camundongos A129.

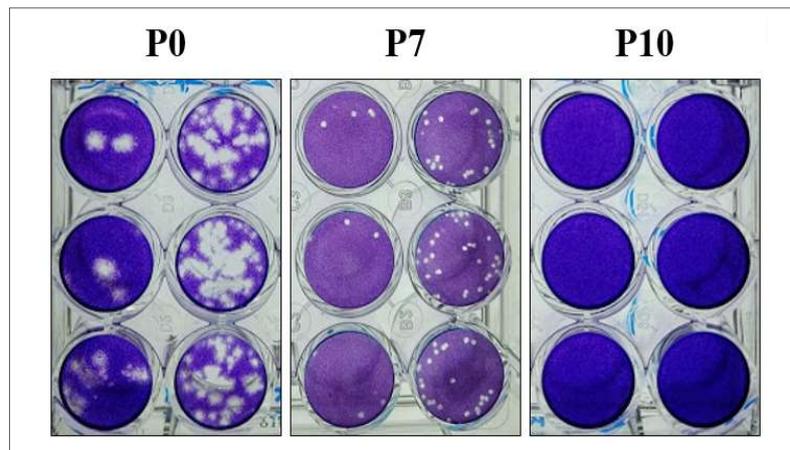


Fonte: O autor.

Legenda: O vírus passado no cérebro de camundongos formou placas significativamente menores quando comparado a cepa parental (PE243).

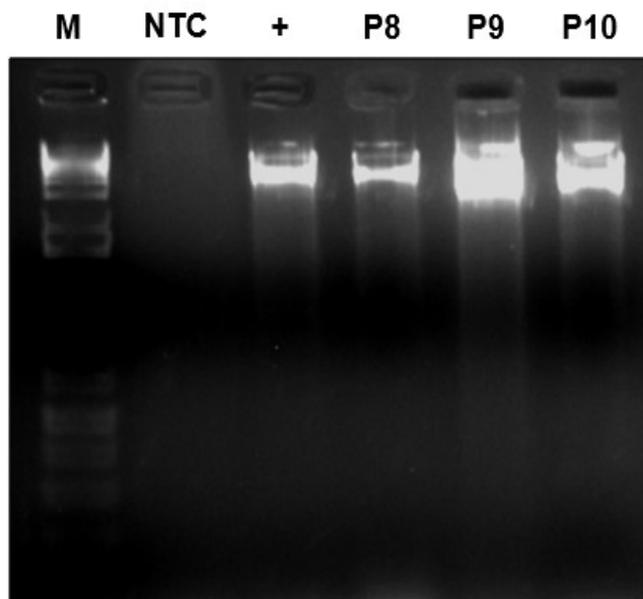
Já na última passagem (P10) o vírus não formou placas. Porém um ensaio PCR foi realizado e este demonstrou a presença viral, concluindo assim que a não formação de placas foi um terceiro fenótipo apresentado pelo vírus. (Figuras 35 e 36). As placas observadas na passagem sete resultaram o título viral de $1,3 \times 10^3$ PFU/ml.

Figura 35 - Ensaio de placas.



Fonte: O autor.

Legenda: A cepa parental (P10) formou placas consideradas grandes quando comparadas a cepa neuroadaptada em camundongos (P7). Já a cepa recuperada na última passagem (P10) não formou placas.

Figura 36 - PCR.

Fonte: O autor.

Legenda: O vírus foi constatado nas passagens 8,9 e 10.

9 DISCUSSÃO

Antes das recentes epidemias, poucos modelos animais de infecção por ZIKV existiam. A primeira cepa isolada MR766 (Uganda, 1947) do ZIKV, foi submetida a uma série de passagens no cérebro de camundongos (DICK *et al.*, 1952). A inoculação do ZIKV MR766 por via intracraniana causou doença neurológica em camundongos adultos (DICK, 1952). Atualmente, os esforços concentraram-se na geração de novos animais imunocompetentes, que possam modelar a infecção causada por isolados mais atuais do ZIKV (MORRISON; DIAMOND, 2017).

Para a realização deste estudo, inicialmente desenvolvemos uma técnica refinada para infecção com o ZIKV em camundongos neonatos e adultos através de inoculação intracerebral. Camundongos neonatos submetidos a técnica de hipotermia, se mantiveram anestesiados para a realização da inoculação viral. O protocolo anestésico utilizando hipotermia é recomendado para neonatos com menos de 4 dias que serão submetidos a procedimentos rápidos. Este processo deve ser realizado com período máximo de 10 minutos e os animais devem ser protegidos do contato direto como gelo para evitar queimaduras de pele (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2016). Camundongos adultos também se mantiveram anestesiados através da associação de Quetamina e Xilazina. O uso de Quetamina e Xilazina como anestésico de roedores é um método amplamente utilizado e deve ser realizada por pessoas capacitadas. O protocolo anestésico deve ser realizado respeitando a dose, que é calculada de acordo com o peso do animal (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2016).

A técnica de inoculação intracerebral foi adaptada a partir de protocolos experimentais utilizados em estudos *in vivo* com o vírus da raiva. Camundongos inoculados pela via intracerebral são modelos bem estabelecidos e caracterizados em ensaios com este vírus (BORDIGNON; ROBERTO, 2013).

Cinco dias após as inoculações intracerebrais, os cérebros dos camundongos (neonatos e adultos) foram coletados, processados e então inoculados em células Vero. Sete dias após a inoculação observou-se efeito citopático, caracterizado pela danificação ou morte das células. Em cultura celular, linhagens de células Vero tem sido amplamente utilizada em ensaios com o ZIKV (PARDY *et al.*, 2017).

Durante os cinco dias após infectados, os camundongos neonatos apresentaram sinais de doença neurológica caracterizado por letargia, tremores, perda de equilíbrio e movimentos de pedalagem. Também foi possível observar que neonatos inoculados com o ZIKV quando

comparados ao grupo controle (inoculados com PBS) apresentavam menor peso e tamanho corporal. Camundongos neonatos da linhagem C57BL/6 inoculados com a cepa PRVABC59 do ZIKV também apresentam sinais de doença neurológica. Após inoculados pelas vias subcutânea ou intraperitoneal estes animais apresentam além de perda de peso e comprometimento do desenvolvimento corporal, sinais como paralisia de membros, lordose, perda de equilíbrio, tremores e ataxia. Doze dias pós infectados os animais sucumbem a doença e morrem (LI, S. *et al.*, 2018). Utilizando o mesmo modelo animal e a mesma cepa viral, Manangeeswaran *et al.* (2017) apresentou dados que também corroboram com os dados aqui relatados. Após serem infectados, os camundongos neonatos apresentaram perda da capacidade motora, perda de equilíbrio, tremores e convulsões que começaram a partir do 13º dia pós infecção (MANANGEESWARAN *et al.*, 2017).

Uma vez refinada a técnica de infecção intracerebral, iniciou-se as passagens seriadas em cérebro e vagina de camundongos imunocompetentes da linhagem Swiss. Passagens virais seriadas em modelo murino, tem como objetivo causar doença ou morte em camundongos adultos com o sistema imunológico hígido (SARATHY *et al.*, 2015). Dez passagens seriadas do ZIKV foram realizadas, utilizando a cepa de origem asiática PE243. Deve-se considerar que uma vez inoculado o vírus, há uma propagação inicial de mutantes que são recuperados entre as passagens até que as variantes selecionadas possam infectar e matar camundongos adultos (AMORIM *et al.*, 2015).

A constatação da presença viral nas amostras coletadas do cérebro e do lavado vaginal dos camundongos Swiss se deu através da utilização do RT-LAMP. Com exceção da última passagem realizada (P10), a presença do vírus foi constatada em todas as passagens anteriores. Recentemente, Da Silva *et al.* (2019) desenvolveram um ensaio RT-LAMP que foi validado utilizando amostras de mosquitos *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* experimentalmente e naturalmente infectadas com ZIKV. O estudo mostrou que o RT-LAMP foi capaz de detectar o RNA viral justamente em amostras que foram diagnosticadas como negativas através da qRT-PCR.

As passagens seriadas foram realizadas sempre ao terceiro dia pós infecção. Antes de serem processados, os cérebros foram pesados e tiveram suas medidas aferidas. Embora o ZIKV tenha sido positivo em todas as amostras, não foram observadas diminuição de tamanho e peso dos cérebros quando comparados ao grupo controle. Camundongos neonatos (1 dia de idade) da linhagem C57BL/6 inoculados com a cepa PRVABC59 do ZIKV via subcutâneo, também não demonstraram alterações dos tamanhos dos cérebros nos dias 6, 9 e 11 pós infecção. No entanto, a média do peso do cérebro de camundongos infectados pelo ZIKV foi

significativamente mais leve que o grupo controle, inoculados com PBS, a partir do 11^o dia pós infecção. Acredita-se que a redução do peso cerebral pela infecção gerada pelo ZIKV pode ser causada por morte celular (LI, S. *et al.*, 2018).

Camundongos Swiss inoculados via intracerebral ou intravaginal com a cepa PE243 do ZIKV não apresentam sinais clínicos da doença durante a realização das passagens seriadas. A cepa Dakar 41525 isolada em Senegal no ano de 1984, também já foi passada (4 passagens) em cérebro de camundongos adultos da linhagem C57BL/6. Para a caracterização da cepa obtida, camundongos de 5 a 6 semanas de idade receberam este inóculo via subcutânea. Em posterior análise, verificou-se que os animais não apresentaram fenótipos da doença. Porém, a avaliação de carga viral mostrou que animais que receberam a cepa adaptada apresentavam uma carga de RNA viral maior em diferentes partes do cérebro quando comparado aos animais que receberam a cepa parental (GORMAN *et al.*, 2018).

Após a verificação de que camundongos da linhagem Swiss não sucumbem a doença mesmo após a realização da passagem viral, realizamos uma nova tentativa utilizando animais nocautes para a sinalização do INF (linhagem A129). De modo geral todos os animais inoculados com o ZIKV durante a realização das passagens seriadas apresentaram perda de peso, posição de lordose e pelos eriçados. Estes sinais são frequentemente observados em animais em situação de dor ou estresse causados por doença. Outras cepas do ZIKV inoculado em camundongos já demonstraram causar estas manifestações clínicas em animais nocautes adultos das linhagens A129 e AG129 (ALIOTA *et al.*, 2016; DOWALL *et al.*, 2016; GOVERO *et al.*, 2016; LAZEAR *et al.*, 2016).

Logo na primeira passagem do vírus constatamos que os camundongos infectados apresentavam conjuntivite que variou entre purulenta e não purulenta. Outra linhagem de camundongos nocaute chamada de IFNAR^{-/-} quando inoculados com cepas brasileira ou da Polinésia Francesa, desenvolvem um quadro de conjuntivite e panuveíte. De acordo com Miner *et al.* (2016) estas manifestações se devem a presença do ZIKV na córnea, íris, nervo óptico, células ganglionares e bipolares na retina. O mesmo se observa para camundongos neonatos imunocompetentes da linhagem BALB/c. Após inoculados com o ZIKV, estes animais apresentam leve purido extraocular amarelo, sugerindo a presença de alterações oculares (BRASIL *et al.*, 2016).

Deve-se ressaltar também que a conjuntivite é um sintoma clínico observado em humanos adultos e também já relatado em fetos de mães infectadas pelo ZIKV (DE PAULA *et al.*, 2016; DUFFY *et al.*, 2009; LUZ; SANTOS; VIEIRA, 2015; MARTINES *et al.*, 2016; ZANLUCA *et al.*, 2015). Em ensaios de infecção transplacentária em camundongos, o ZIKV

também se demonstrou capaz de causar complicações oculares em neonatos (DE PAULA *et al.*, 2016; MIRANDA *et al.*, 2016).

A susceptibilidade a infecção pelo ZIKV em camundongos A129 está intrinsicamente relacionada a deficiência na produção, em receptores ou na sinalização de interferons. Estes animais, uma vez expostos ao patógeno, apresentam altas cargas virais principalmente no cérebro e na medula espinhal que levam a uma grave manifestação de doença neurológica (ALIOTA *et al.*, 2016; DOWALL *et al.*, 2016). Neste trabalho demonstramos que camundongos A129 inoculados via intracerebral com a cepa asiática PE243 do ZIKV apresentam complicações neurológicas e sucumbem a doença causada pelo vírus. A evolução dos sinais neurológicos observados neste modelo pode estar relacionado ao fato de que o IFN- γ possa desempenhar um papel neuroprotetor (LOBIGS *et al.*, 2003).

O grau em que camundongos deficientes em IFN modelam a extensão e a gravidade da infecção por flavivírus em humanos é desconhecido. Porém assim como nos casos de infecção em humanos, o ZIKV pode infectar células tronco neurais no cérebro em desenvolvimento destes animais. Duas áreas do cérebro de camundongos adultos contêm células-tronco neurais: a zona subventricular do prosencéfalo anterior e a zona subgranular do hipocampo. Camundongos de 6 semanas de idade deficientes no fator regulador de interferon inoculados com o ZIKV, mostrou que o ZIKV pode levar a evidências pronunciadas de infecção em células tronco neurais adultas, levando à morte celular e redução da proliferação celular (LI, H. *et al.*, 2016).

Nosso estudo demonstrou que camundongos A129 inoculados com a cepa PE243 apresentam sinais neurológicos a partir da segunda passagem cerebral no oitavo dia pós infecção. Neste momento os animais se apresentaram letárgicos, seguido de paralisia parcial ou total de membros que ocorreu a partir da terceira passagem. De modo geral, camundongos nocautes utilizados para modelar infecções causadas por outros flavivírus neurotrópicos, apresentam complicações neurológicas cerca de dois dias após inoculados (LOBIGS *et al.*, 2003). A inoculação da cepa africana MR766 em camundongos de 5 a 6 semanas de idade, da linhagem C57BL/6 nocautes para o STAT2, levou ao aparecimento de letargia e movimentos limitados ao terceiro dias pós infecção (TRIPATHI *et al.*, 2017).

Neonatos das linhagens BALB/c, C57BL/6, ICR, Kunming e Swiss inoculados com o ZIKV apresentaram paralisia de membros atribuída a presença viral em altos títulos nos cérebros dos animais. A paralisia nestes animais ocorreu entre seis e doze dias pós infecção (FERNANDES *et al.*, 2017; LI, S. *et al.*, 2018).

Nas passagens 5, 6 e 7 houve um aumento das manifestações neurológicas desencadeadas pelo ZIKV nos camundongos A129 experimentalmente infectados pela cepa PE243. Os animais apresentaram de modo geral incoordenação motora, paralisia de membros, marcha em círculos, estupor, tremores e inclinação da cabeça. Após a necropsia de um animal infectado na passagem 7, verificou-se que o cérebro se encontrava edemaciado. Alterações no tecido cerebral de camundongos infectados pelo ZIKV como hipoplasia cerebelar, nódulos microgliais e necrose neuronal e glial, já foram amplamente estudadas e estas foram relacionadas ao aparecimento de sinais neurológicos nestes animais (ALIOTA *et al.*, 2016; DOWALL *et al.*, 2016; 2016; GOVERO *et al.*, 2016; LAZEAR *et al.*, 2016; LI, H. *et al.* 2016; YU, J. *et al.*, 2017).

Estudos *in vivo* têm mostrado que camundongos infectados pelo ZIKV apresentam carga viral em vários órgãos, com destaque para o baço, cérebro e gônadas. O ZIKV pode causar alterações ou lesões no tecido comprometendo a função destes órgãos. (DOWALL *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2016). Neste estudo observamos que um camundongo infectado na passagem 7 apresentou esplenomegalia, coloração escura e a presença de um ponto esbranquiçado no tecido, onde sugere-se o início de necrose do tecido.

Camundongos A129 inoculados nas passagens 5, 6 e 7 apresentaram edema e congestão passiva nos membros posteriores. Li Shuxuan *et al.*, 2018 demonstraram que camundongos neonatos inoculados com o ZIKV, apresentam o vírus detectável em fibra muscular de membros posteriores. Em camundongos adultos (4 a 8 semanas de idade) da linhagem AG129 o ZIKV causou degeneração de miofibras dos membros posteriores e necrose (ALIOTA *et al.*, 2016). Dados ainda não publicados de um estudo comparativo, relativo a virulência da cepa de origem asiática PE243 comparada a cepa de origem africana MR766 em camundongos adultos imunocompetentes, observou-se que a cepa africana é capaz de causar um processo inflamatório nos membros posteriores destes animais. Estudos iniciais após a descoberta do ZIKV exigiram muitas passagens da cepa MR766 em cérebro de camundongos adultos imunocompetentes, o que resultou na aparição de fenótipos consistentes durante a replicação da doença (DICK *et al.*, 1952).

Durante a realização das passagens seriadas, um camundongo apresentou distensão abdominal. Verificou-se então que este apresentava um quadro de timpanismo gastrointestinal. Flavivírus podem infectar neurônios entéricos causando morte celular, inflamação e dilatação intestinal. O ZIKV é capaz de infectar o sistema nervoso entérico de camundongos, interrompendo o movimento e causando bloqueios intestinais (WHITE *et al.*, 2018).

Bexiga atônica ou arreflexa foi observado em camundongos infectados pelo ZIKV nas passagens 4, 5, 6 e 7. Camundongos Swiss neonatos inoculados via subcutânea apresentaram bexiga urinária atônica 12 dias pós infecção (FERNANDES *et al.*, 2017). A atonicidade da bexiga urinária causada pelo ZIKV também já foi relatada em um caso de infecção em humano (MÉCHARLES *et al.*, 2016).

Após a realização das dez passagens seriadas em cérebro de camundongos nocautes da linhagem A129, um ensaio de placa foi realizado utilizando alíquotas do vírus parental (P0) e do vírus recuperado nas passagens sete e dez (P7 e P10). Verificamos neste ensaio que o vírus PE243 passado em camundongos pode apresentar fenótipos diferentes para a formação de placas. No ensaio realizado com o vírus parental podemos verificar a formação de placas grandes, enquanto na P7 observamos placas pequenas. Já na P10 não foi observada formação de placas. Um estudo de caracterização de placas realizado com a cepa do ZIKV denominada ZIKV/Hu/S36/Chiba/2016, demonstrou que este vírus é capaz de formar dois tipos de placas: grandes e pequenas. Análises genéticas demonstraram que os clones que formaram pequenas placas, possuem um nucleotídeo formado com adenina na posição 796, enquanto clones que formaram placas grandes possuem um nucleotídeo de guanina nesta posição. Sugeriu-se então que esta posição no genoma do vírus estava relacionada ao tamanho das placas formadas (KATO *et al.*, 2017).

Através de genética reversa a cepa MR766 do ZIKV sofreu uma mutação na posição 796 para a introdução de um nucleotídeo com adenina, formando o mutante G796A. A mutação G796A reduziu claramente a taxa de crescimento do vírus parental em células Vero, porém os vírus parentais e mutantes G796A cresceram de forma semelhante em células C6 / 36 (KATO *et al.*, 2017). Goh Kenneth Choon Meng *et al.* (2016) sugerem que formação de placa e o tamanho da placa resultante não são determinados apenas pela taxa de replicação viral. Em vez disso, os fatores da célula hospedeira podem regular a disseminação de célula para célula (GOH *et al.*, 2016; MOSER *et al.*, 2018).

A mutação também diminuiu a virulência da cepa MR766 em camundongos nocautes para IFNAR1. A sobrevivência dos camundongos inoculados com a cepa G796A foi maior do que a dos animais inoculados com a cepa parental MR766. Todos os animais inoculados com a cepa MR766 (n=6) morreram oito dias pós infecção. Já os animais infectados pela cepa G796A (n=6) morreram onze dias pós a infecção. Um animal infectado do grupo infectado pela cepa modificada sobreviveu (KATO *et al.*, 2017). Estes resultados indicam que a variação de aminoácidos na posição 796 é um determinante molecular para a morfologia de placas, propriedade de crescimento e virulência em camundongos.

Isolados de linhagens africanas (ArD 41525) e asiáticas (CPC-0740, SV0127-14) foram utilizados para investigar potenciais diferenças fenotípicas *in vitro* e *in vivo*. O isolado africano exibiu um fenótipo de placa grande (~ 3-4 mm) em células das linhagens Vero e HEK-293, enquanto que os isolados asiáticos exibiram um pequeno fenótipo de placa (~ 1-2 mm) ou não produziram quaisquer placas. A infecção de camundongos *Ifnar1* $-/-$ com o isolado africano produziu uma doença fatal, enquanto a infecção com os isolados asiáticos produziu um atraso no tempo até a morte ou uma taxa de mortalidade significativamente menor quando comparado ao isolado africano (SMITH *et al.*, 2018).

10 CONCLUSÃO

- a) Esse trabalho proporcionou a realização da neuroadaptação da cepa PE243 do vírus Zika em camundongos.
- b) Demonstramos através de ensaios de formação de placas que a passagem do vírus em cérebro de camundongos promoveu a mudança de fenótipo do vírus.
- c) Apresentamos pela primeira vez uma descrição *in vivo* de sinais clínicos observáveis causados pela infecção viral utilizando o primeiro isolado no Estado de Pernambuco (PE243).
- d) Adicionalmente, nosso trabalho contribuiu para o início de uma série de novos estudos *in vivo* no Instituto Aggeu Magalhães (IAM) utilizando camundongos nocautes da linhagem A129.

11 PERSPECTIVAS FUTURAS

- a) Caracterizar a cepa obtida da passagem seriada em cérebros de camundongos imunodeficientes, utilizando camundongos com o sistema imunológico hígido;
- b) Analisar as sequências genômicas da cepa neuroadaptada em camundongos e identificar os marcadores moleculares associados às mudanças fenotípicas identificadas;
Avaliar a carga viral e os efeitos histopatológicos causados pela cepa neuroadaptada em cérebro e baço de camundongos com o sistema imunológico hígido;
- c) Padronizar um novo modelo animal para a realização de testes vacinais e estudos com antivirais.

REFERÊNCIAS

- ALIOTA, M. T. *et al.* Characterization of lethal Zika virus infection in AG129 mice. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. e0004682, 2016.
- AMORIM, J. H. *et al.* Dengue virus models based on mice as experimental hosts. **Future Virology**, London, v. 10, n. 7, p. 835-844, 2015.
- AN, J. *et al.* Development of a novel mouse model for dengue virus infection. **Virology**, London, v. 263, n. 1, p. 70-77, 1999.
- AKEY, D. L. *et al.* Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. **Science**, New York, v. 343, p. 881-885, 2014.
- ATKINSON, B. *et al.* Detection of Zika virus in semen. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 22, n. 5, p. 940, 2016.
- ATRASHEUSKAYA, A. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Malden, v. 35, n. 1, p. 33-42, 2003.
- BALSITIS, S. J. *et al.* Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e1000790, 2010.
- BARDINA, S. V. *et al.* Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. **Science**, New York, v. 356, n. 6334, p. 175-180, 2017.
- BARJAS-CASTRO, M. L. *et al.* Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, Arlington, v. 56, n. 7, p. 1684-1688, 2016.
- BARONTI, C. *et al.* Complete coding sequence of Zika virus from a French Polynesia outbreak in 2013. **Genome announcements**, Washington, v. 2, n. 3, p. 00500-14, 2014.
- BARRETO-VIEIRA, D. F. *et al.* Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 8, p. 532-534, 2016.
- BAUD, D. *et al.* Zika virus: A new threat to human reproduction. **American journal of reproductive immunology**. New York, 1989, v. 77, n. 2, p. 12614, 2016.
- BEARCROFT, W. G. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 50, n. 5, p. 442-448, 1956.
- BELL, T. M.; FIELD, E. J.; NARANG, H. K. Zika virus infection of the central nervous system of mice. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, Wien; New York, Springer-Verlag, v. 35, n. 2, p. 183-193, 1970.
- BENTE, D. A.; RICO-HESSE, R. Models of dengue virus infection. **Drug discovery today Disease models**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 97-103, 2005.

BERGE, T. International Catalog of Arboviruses: 2. ed. **National Institute of Allergy and Infectious**, Washington, D.C, v. 789, p. 75-8301, 1975.

BESNARD, M. *et al.* Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill**, Saint-Maurice, v. 19, p. 13, 2014.

BOGOCH, I. I. *et al.* Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. **Lancet**, London, v. 387, p. 335–6, 2016.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília: Ministério da Saúde, v. 47, n. 38, 2016. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/20/2016-033---Dengue-SE49-publicacao.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2018.

BORDIGNON, J.; ROBERTO, Z. C. Rabies Diagnosis. *In: Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis. Research and Prevention*, Cambridge, v. 2, p. 133-140, 2014.

BOWEN, J. R. *et al.* Zika virus antagonizes type I interferon responses during infection of human dendritic cells. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. e1006164, 2017.

BUITRAGO, B. *et al.* Mathematical modelling of Zika virus in Brazil. *In: Asian Pacific Journal of Tropical Disease. ScienceDirect*, Singapore, v. 6, n. 9, p. 673-679, 2017.

BRADLEY, M. P.; NAGAMINE, C. M. Animal models of Zika virus. **Comparative medicine**, Memphis, v. 67, n. 3, p. 242-252, 2017.

BRAULT, J. B. *et al.* Comparative analysis between flaviviruses reveals specific neural stem cell tropism for Zika virus in the mouse developing neocortex. **EBioMedicine**, Amsterdam, v. 10, p. 71-76, 2016.

BRASIL, P. *et al.* Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro — Preliminary report. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 375, n. 24, p.2321-2334, 2016.

BRASIL, P. *et al.* Zika Virus outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical characterization, epidemiological and virological aspects. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. e0004636, 2016.

BRAY, M. *et al.* Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. **Journal of virology**, Baltimore, v. 72, n. 2, p. 1647-1651, 1998.

BRAY, M. *et al.* A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 179, suppl., 1, p. S248-S258, 1999.

BRIANT, L. *et al.* Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. **Virology**, London, v. 464–465, p. 26–32, 2014.

CAMPOS, T. D. *et al.* Revisiting key entry routes of human epidemic arboviruses into the mainland Americas through large-scale phylogenomics. **International Journal of Genomics**, Brasil, v. 2018, p. 9, 2018.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1885-1886, 2015.

CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, 2014.

CARTEAUX, G. *et al.* Zika virus associated with meningoencephalitis., **The New England journal of medicine**, Boston, v. 374, n. 16, p. 1595-1596, 2016.

CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.44, p. 649–688, 1990.

CHAN, J. F-W. *et al.* Zika virus infection in dexamethasone-immunosuppressed mice demonstrating disseminated infection with multi-organ involvement including orchitis effectively treated by recombinant type I interferons. **EBioMedicine**, Amsterdam, v. 14, p. 112-122, 2016.

CHOUIN-CARNEIRO, T. *et al.* Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e0004543, 2016.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (Brasil). **Resolução Normativa n. 33, de 18 de novembro de 2016**. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22073702/do1-2016-11-21-resolucao-normativa-n-33-de-18-de-novembro-de-2016-22073453. Acesso em: 20 jun. 2019.

COSTA, F. *et al.* Emergence of congenital Zika syndrome: Viewpoint from the front lines. **Annals of internal medicine**, Philadelphia, v. 164, n. 10, p. 689-691, 2016.

COSTA, V. V. *et al.* A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN- γ in host resistance to infection. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. e1663, 2012.

COX, B. D.; STANTON, R. A.; SCHINAZI, R. F. Predicting Zika virus structural biology: Challenges and opportunities for intervention. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, Oxford, p. 1–9, 2015.

CUNHA, M. S. *et al.* First complete genome sequence of Zika virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an autochthonous transmission in Brazil. **Genome announcements**, Washington, v. 4, p. 0032-16, n. 2, 2016.

DAFFIS, S. *et al.* Interferon regulatory factor IRF-7 induces the antiviral alpha interferon response and protects against lethal West Nile virus infection. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 82, p. 8465-8475, 2008.

DAI, L. *et al.* Structures of the Zika virus envelope protein and complex with a flavivirus broadly protective antibody. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 19, p. 696–704, 2016.

DA SILVA, S. J. R. *et al.* Development and validation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in mosquito samples from Brazil. **Scientific reports**, London, v. 9, n. 1, p. 4494, 14 mar. 2019.

DE ONIS, M. *et al.* The WHO multicentre growth reference study: planning, study design, and methodology. **Food and nutrition bulletin**, Tokyo, v. 25, n. 1, p. 15-26, 2004.

DE PAULA, F. B. *et al.* Ocular findings in infants with microcephaly associated with presumed Zika virus congenital infection in Salvador, Brazil. **JAMA Ophthalmology**, Chicago, v. 134, p. 529-535, 2016.

DIAGNE, C. T. *et al.* Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. **BMC infectious diseases**, London, v. 15, p. 492, 2015.

DIALLO, D. *et al.* Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PLoS one**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. e109442, 2014.

DICK; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.

DICK, G. W. A. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 46, n. 5, p. 521-534, 1952.

DICK, G. W. A. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda (Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 47, n. 1, p. 13-48, 1953.

DOWALL, S. D. *et al.* A susceptible mouse model for Zika virus infection. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. 4658, 5 maio 2016.

DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England journal of medicine**, Boston, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Rapid risk assessment**: Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Stockholm, 10 dec. 2015. Disponível em: http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1413. Acesso em: 20 ago. 2018.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Zika virus infection**: Epidemiological situation. Stockholm, 27 jan. 2017. Disponível em: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/zika_virus_infection/zika-outbreak/Pages/epidemiological-situation.aspx. Acesso em: 20 ago. 2018.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **Journal of Hygiene**, Los Angeles, v. 83, p. 213-219, 1979.

FAHEEM, M. *et al.* Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. **BMC medical genomics**, London, v. 8, Suppl. 1, p. S4, 2015.

FAYE, O. *et al.* Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. e0002636, 2014.

FERNANDES, N. *et al.* Experimental Zika virus infection induces spinal cord injury and encephalitis in newborn Swiss mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, São Paulo, Brasil, v. 69, n. 2, p. 63-71, 2017.

FILIPE, A. R.; MARTINS, C. M.; ROCHA, H. Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. **Archiv fur die gesamte Virusforschung**, Wien, v. 43, n. 4, p. 315-319, 1972.

FOY, B. D. *et al.* Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 17, n. 5, p. 880-882, 2011.

FREDERICKSEN, B. *et al.* Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 82, p. 609-616, 2008.

GOH, K. C. M. *et al.* Molecular determinants of plaque size as an indicator of dengue virus attenuation. **Scientific reports**, London, v. 6, p. 26100, 2016.

GOODFELLOW, F. T. *et al.* Zika virus induced mortality and microcephaly in chicken embryos. **Stem cells and development**, Larchmont, v. 25, n. 22, p. 1691-1697, 2016.

GORMAN, M. J. *et al.* An immunocompetent mouse model of Zika virus infection. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 23, n. 5, p. 672-685.e6, 2018.

GOVERO, J. *et al.* Zika virus infection damages the testes in mice. **Nature**, London, v. 540, n. 7633, p. 438-442, 2016.

GRANT, A. *et al.* Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 19, n. 6, p. 882-890, 2016.

GUEDES, D. R. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging microbes & infections**, New York, v. 6, n. 8, p. e69, 2017.

GUERBOIS, M. *et al.* Outbreak of Zika virus infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and first confirmed transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 214, n. 9, p. 1349-1356, 2016.

GUO, J. Studies using IPS cells support a possible link between ZIKA and microcephaly. **Cell & bioscience**, London, v. 6, p. 28, 2016.

HADDOW, A. D. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: Geographic expansion of the Asian lineage. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, p. 1477, 2012.

HALAI, U-A. *et al.* Maternal Zika virus disease severity, virus load, prior dengue antibodies, and their relationship to birth outcomes. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, Chicago, v. 65, n. 6, p. 877-883, 2017.

HALLER, O.; KOCHS, G.; WEBER, F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. **Virology**, London, v. 344, p. 119-130, 2005.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: Dawn of a New Era. **Research**, London, v. 4, p. F1000, 2015.

HAMEL, R. *et al.* Biology of zika virus infection in human skin cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 89, p. 8880-96, 2015.

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 15, n. 9, p. 1347-1350, 2009.

HEANG, V. *et al.* Zika virus infection, Cambodia, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 18, p. 349-351, 2012.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika virus spreads to new areas - Region of the Americas, may 2015-january 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 65, p. 55-8, 2016.

HEUKELBACH, J. *et al.* Zika virus outbreak in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, Italy, v. 10, n. 2, p. 116-120, 2016.

HEYMANN, D. L. *et al.* Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? **Lancet**, London, v. 11, p. 187, 2016.

HOTTA, S. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus., **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 90, n. 1, p. 1-9, 1952.

HUGHES, R. A. C. *et al.* Supportive care for patients with Guillain-Barré syndrome. **Archives of neurology**, Chicago, v. 62, n. 8, p. 1194-1198, 2005.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **The Journal of general virology**, London, v. 40, n. 3, p. 531-544, 1978.

IMPERATO, P. J. The convergence of a virus, mosquitoes, and human travel in globalizing the Zika epidemic. **Journal of Community Health**, New York, v. 41, p. 674-679, 2016.

JULANDER, J. G. *et al.* C3H/HeN mouse model for the evaluation of antiviral agents for the treatment of Venezuelan equine encephalitis virus infection. **Antiviral research**, Amsterdam, v. 78, n.3, p. 230-241, 2008.

JULANDER, J. G. *et al.* Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. **Antiviral research**, Amsterdam, v. 137, p. 14-22, 2017.

KARIMI, O. *et al.* Thrombocytopenia and subcutaneous bleedings in a patient with Zika virus infection., **Lancet**, London, England, v. 387, n. 10022, p. 939-940, 2016

KATO, F. *et al.* Characterization of large and small-plaque variants in the Zika virus clinical isolate ZIKV/Hu/S36/Chiba/2016. **Scientific reports**, London, v. 7, n. 1, p. 16160, 2017.

KOK, W. M. New developments in flavivirus drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discov**, London, v. 11, n. 5, p. 433-445, 2016.

KUEHNERT, M. J. *et al.* Screening of blood donations for Zika virus infection - Puerto Rico, april 3-june 11, 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 65, n. 24, p. 627-628, 2016.

KUHN, R. J. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 108, p. 717-725, 2002.

KUMAR, A. *et al.* Zika virus inhibits type -I interferon production and downstream signaling. **EMBO reports**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 1766-1775, 2016.

KUMAR, M. *et al.* A guinea pig model of Zika virus infection. **Virology journal**, London, v. 14, n. 1, p. 75, 2017.

KUNO, G. *et al.* Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, p. 73–83, 1998.

KUNO, G.; CHANG, G-JJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viroses. **Archives of Virology**, Wien, v. 152, p. 687–696, 2007.

LAZEAR, H. M. *et al.* A mouse model of Zika virus pathogenesis. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 720–730, 11 May 2016.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Phylogeny of Zika virus in Western Hemisphere, 2015. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 22, n. 5, p. 933–935, 1 May 2016.

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

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

LEE, Y. R. *et al.* Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. **Virology**, London, v. 374, n. 2, p. 240–8, 2008.

LI, H. *et al.* Zika virus infects neural progenitors in the adult mouse brain and alters proliferation. **Cell stem cell**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 593–598, 3 Nov. 2016.

LI, S. *et al.* Zika virus fatally infects wild type neonatal mice and replicates in central nervous system. **Viruses**, Basel, Switzerland, v. 10, n. 1, p. 49, 2018.

LIM, S. P.; NOBLE, C. G.; SHI, P-Y. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 119, p. 57–67, 2015.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. (ed.). **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007. v. 1, p. 1102-1152.

LINDENBACH, B. D. *et al.* Flaviviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**, Irvine, 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v. 1, p. 712–794, 2013.

LOBIGS, M. *et al.* Role of type I and type II interferon responses in recovery from infection with an encephalitic flavivirus. **The Journal of general virology**, London, v. 84, n. 3, p. 567–572, 1 mar. 2003.

LUO, D.; VASUDEVAN, S. G.; LESCAR, J. The flavivirus NS2B–NS3 protease–helicase as a target for antiviral drug development. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 118, p. 148–158, 2015.

LUZ, K. G.; DOS SANTOS, G. I. V.; VIEIRA, R. M. Zika virus fever. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 785-788, 2015

MANANGEESWARAN, M.; IRELAND, D. D. C.; VERTHELYI, D. Zika (PRVABC59) infection is associated with T cell infiltration and neurodegeneration in CNS of immunocompetent neonatal C57Bl/6 mice. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 12, n. 11, p. e1006004, 2016.

MARANO, G. *et al.* Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and transfusion medicine. **Blood Transfus**, Milano, v. 14, n. 2, p. 95-100, 2016.

MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 18, p. 411–415, 1969.

MARTINES, R. B. *et al.* Notes from the field: Evidence of Zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses — Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 65, n. 6, p. 159-160, 2016.

MAWSON, A. R. Pathogenesis of Zika virus-associated embryopathy. **BioResearch open access**, New Rochelle, v. 5, n. 1, p. 171-176, 2016.

MOSER, L. A. *et al.* Growth and adaptation of Zika virus in mammalian and mosquito cells. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 12, n. 11, p. e0006880, 2018.

MOTA, M. T. O. *et al.* Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 47, p. 38–50, 2016.

MCCARTHY, M. Severe eye damage in infants with microcephaly is presumed to be due to Zika virus. **British Medical Journal (Clinical Research Edition)**, London, v. 352, p. 855, 2016.

MCCRAE, A. W.; KIRYA, B. G. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 76, n. 4, p. 552-562, 1982.

MEANEY-DELMAN, D. *et al.* Prolonged detection of Zika virus RNA in pregnant women. **Obstetrics and gynecology**, New York, v. 128, n. 4, p. 724-730, 2016.

MÉCHARLES, S. Acute myelitis due to Zika virus infection. **Lancet**, London, England, v. 387, n. 10026, p. 1481, 2016.

MEERS, C. P. D. Adaptation of the 17D yellow fever virus to mouse brain by serial passage. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 53, n. 6, p. 445-457, 1959.

MEIER, K. C. *et al.* A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 10, p. e1000614, 9 out. 2009.

MINER, J. J. *et al.* Zika virus infection in mice causes panuveitis with shedding of virus in tears. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 16, n. 12, p. 3208-3218, 2016.

MINER, J. J. *et al.* Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 16, n. 5, p. 1081-1091, 2016.

MENESES, J. D. A. *et al.* Lessons learned at the epicenter of Brazil's congenital Zika epidemic: Evidence from 87 confirmed cases. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 64, n. 10, p. 1302-1308, May 2017.

MLAKAR, J. *et al.* Zika virus associated with microcephaly. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 374, p. 951-958, 2016.

MIRANDA, H. A. *et al.* Expanded spectrum of congenital ocular findings in microcephaly with presumed Zika infection. **Ophthalmology**, Rochester, v. 123, n. 8, p. 1788-1794, 2016.

MOORE, D. L. *et al.* Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 69, n. 1, p. 49-64, 1975.

MOREIRA, J. *et al.* Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clinical microbiology and infection**, Wiesbaden, v. 23, n. 5, p. 296-305, 2017.

MORRISON, T. E.; DIAMOND, M. S. Animal models of Zika virus infection, pathogenesis, and immunity. **Journal of virology**, Baltimore, v. 91, n. 8, p. e00009-17, 2017.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 13-22, 2005.

MUKHOPADHYAY, S. *et al.* Structure of West Nile virus. **Science**, New York, v. 302, n. 5643, p. 248, 2003.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 98, p. 192–208, 2013.

MULLER, U. *et al.* Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. **Science**, New York, v. 264, n. 5167, p. 1918-1921, 1994.

MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 10, p. 1887, 2015.

MUSSO, D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, november 2013 to february 2014. **Eurosurveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles - European communicable disease bulletin**, Saint-Maurice, v. 19, n. 14, p. 20761, 2014.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V.; GUBLER, D. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **Lancet**, London, v. 386, n. 9990, p. 243–244, 2015.

NAZERAI, L.; PRAVSGAARD, C. J.; RANDRUP, T. A. A “furry-tale” of Zika virus infection: What have we learned from animal models? **Viruses**, Basel, v. 11, n. 1, p. E29, 2019.

NAZERAI, L. *et al.* A new model to study protective immunity to Zika virus infection in mice with intact type I interferon signaling. **Frontiers in immunology**, Lausanne, v. 9, p. 593, 2018.

NICOLE, N. A129 and AG129 mice are valuable for evaluating Zika virus vaccines and treatments. **Marshall BioResources**. 2016. Disponível em: <https://www.marshallbio.com/a129-and-ag129-mice-are-valuable-for-evaluating-zika-virus-vaccines-and-treatments>. Acesso em: 5 set. 2018.

OEHLER, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain–Barre syndrome - case report, French Polynesia, december 2013. **Euro Surveill**, Saint-Maurice, v. 19, n. 9, p. 20720, 2014.

OLIVEIRA, M. A. *et al.* Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, Carnforth, v. 47, p. 6-7, 2016.

OLIVEIRA, S. I. *et al.* Persistence of Zika virus in semen 93 days after the onset of symptoms. **The journal Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. Barcelona, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.10.009>. Acesso em: 22 ago. 2018.

OLSONI, J. G. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonésia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 75, n. 3, p. 389-393, 1981.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Current Zika Product Pipeline**. Geneva: OMS, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/csr/research-and-development/zika-rd-pipeline.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Guillain-Barré syndrome – Brazil**. Geneva: OMS, 8 Feb. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/8-february-2016-gbs-brazil/en/>. Acesso em: 23 jul. 2018.

PANYASRIVANIT, M. *et al.* Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. **Journal of General Virology**, London, v. 90, p. 448-56, 2009.

PANTOJA, P. *et al.* Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. **Nature communications**, London, v. 8, p. 15674, 2017.

PARDY, R. D. *et al.* Analysis of the T cell response to Zika virus and identification of a novel CD8⁺ T cell epitope in immunocompetent mice. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. e1006184, 2017.

PATY, M. C. The expansion of vector-borne diseases and the implications for blood transfusion safety: The case of West Nile Virus, dengue and chikungunya. **Transfusion clinique et biologique: journal de la Societe francaise de transfusion sanguine**, Paris, v. 20, n. 2, p. 165-173, 2013.

PENA, L. *et al.* Delivery of a foot-and-mouth disease virus empty capsid subunit antigen with nonstructural protein 2B improves protection of swine. **Vaccine**, London, v. 26, p. 5689-5699, 2008.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. **Current opinion in virology**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 168-175, 2012.

PLANTE, K. S. *et al.* Extended preclinical safety, efficacy and stability testing of a live-attenuated chikungunya vaccine candidate. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e0004007, 2015.

PRASAD, V. M. *et al.* Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/nsmb/journal/vaop/ncurrent/full/nsmb.3352.html>. Acesso em: 20 ago. 2018.

PRIYAMVADA, L. *et al.* Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology. **Emerging microbes & infections**, New York, v. 6, n. 5, p. e33, 2017.

RASMUSSEN, S. A. *et al.* Zika Virus and birth defects--Reviewing the evidence for causality. **The New England journal of medicine**, Boston, v. 374, n. 20, p. 1981-1987, 2016.

REAGAN, R. L.; CHANG, S. C.; BRUECKNER, A. L. Electron micrographs of erythrocytes from Swiss albino mice infected with Zika virus. **Texas reports on biology and medicine**, Galveston, v. 13, n. 4, p. 934-938, 1954.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; BANDEIRA, A. C.; FRANCO-PAREDES, C. The expanding spectrum of modes of transmission of Zika virus: a global concern. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, London, v. 15, p. 13, 2016.

ROSSI, S. L. *et al.* Characterization of a novel murine model to study Zika virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 94, n. 6, p. 1362-1369, 1 jun. 2016.

ROUNDY, C. M. *et al.* Variation in *Aedes aegypti* mosquito competence for Zika virus transmission. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 23, n. 4, p. 625-632, 2017.

SABIN, A. B.; SCHLESINGER, R. W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, New York, v. 101, n. 2634, p. 640-642, 1945.

SARATHY, V. V. *et al.* Mouse models of dengue virus infection for vaccine testing. **Vaccine**, London, v. 33, n. 50, p. 7051-7060, 2015.

SARNO, M. *et al.* Zika virus infection and stillbirths: A case of hydrops fetalis, hydranencephaly and fetal demise. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 10, n. 2, p. e0004517 2016.

SCATURRO, P. *et al.* Dengue virus non-structural protein 1 modulates infectious particle production via interaction with the structural proteins. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 11, n. 11, p. e1005277, 2015.

SCHMITT, K. *et al.* Zika viral infection and neutralizing human antibody response in a BLT humanized mouse model. **Virology**, London, v. 515, p. 235-242, 2018.

SCHNEIDER, W. M.; CHEVILLOTTE, M. D.; RICE, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. **Annual review of immunology**, Palo Alto, Calif, v. 32, p. 513-545, 2014.

SEMPLE, B. D. *et al.* Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in neurobiology**, Oxford, New York, v. 106-107, p. 1-16, 2013.

SHRESTA, S. *et al.* Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. **Journal of virology**, Baltimore, v. 78, n. 6, p. 2701–2710, 1 mar. 2004.

SIDDHARTHAN, V. Persistent West Nile virus associated with a neurological sequela in hamsters identified by motor unit number estimation. **Journal of virology**, Baltimore, v. 83, n. 9, p. 4251-4261, 2009.

SIMPSON, D. I. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 58, n. 7, p. 335–338, 1964.

SIROHI, D. *et al.* The 3.8Å resolution cryo-EM structure of Zika Virus. **Science**, New York, v. 352, n. 6284, p. 467–470, 2016.

SMILOVIĆ, V. *et al.* A novel reporter gene assay for interferons based on CHO-K1 cells, **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam. v. 333, p. 192-196, 2008.

SMITH, D. R. *et al.* Neuropathogenesis of Zika virus in a highly susceptible immunocompetent mouse model after antibody blockade of type I interferon. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e0005296, 2017.

SMITH, D. R. *et al.* African and Asian Zika virus isolates display phenotypic differences both in vitro and in vivo. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 98, n. 2, p. 432-444, 2018.

SMITHBURN, K. C. Neutralizing antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of long-time residents of Malaya and Borneo. **American journal of hygiene**, Baltimore, v. 59, p. 157–163, 1954.

SONG, J. *et al.* Instrument-free point-of-care molecular detection of Zika virus. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 88, n. 14, p. 7289-7294, Jul. 2016.

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

SREEDHARAN J. The Zika virus: a new threat from mosquito. **Scientia**, Bristol, v. 11, p. 9–17, 2016.

TANG, H. *et al.* Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016.

TAPPE, D. *et al.* Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 205, n. 3, p. 269-73, 2015.

TRIPATHI, S. *et al.* A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 13, n. 3, p. e1006258, 2017.

VALERO-LAPCHIK, V. B.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e Manejos de Animais de Laboratório**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2017. v. 1.

VAN, D. G. G.; JACOB, W.; PATTYN, S. R. Ebola virus virulence for newborn mice. **Journal of medical virology**, New York, v. 4, n. 3, p. 239-240, 1979.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Flavivirus transmission focusing on Zika. **Current Opinion in Virology**, New York, v. 22, p. 30–35, 2017.

VENTURA, C. V. *et al.* Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **Lancet**, London, v. 387, n. 10015, p. 228, 2016.

WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Zika Virus: Diagnostics for an emerging pandemic threat. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 54, n. 4, p. 860-7, Apr. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26888897>. Acesso em: 12 nov. 2018. Acesso em: 27 ago. 2017.

WAY, J. H.; BOWEN, E. T.; PLATT, G. S. Comparative studies of some African arboviruses in cell culture and in mice. **The Journal of general virology**, London, v. 30, n. 1, p. 123-130, 1976.

WEGER-LUCARELLI, J. *et al.* Development and characterization of recombinant virus generated from a new world Zika virus infectious Clone. **Journal of virology**, Baltimore, v. 91, n. 1, p. e01765-16, 1 jan. 2017.

WERNER, H. *et al.* Intrauterine Zika virus infection and microcephaly: correlation of perinatal imaging and three-dimensional virtual physical models. **Ultrasound in obstetrics & gynecology**, Carnforth, v. 47, n. 5, p. 657-660, 2016.

WIDMAN, D. G. *et al.* A reverse genetics platform that spans the Zika virus family tree. **mBio**, Washington, v. 8, n. 2, 7 Mar. 2017.

WHITE, J. P.; XIONG, S.; MALVIN, N. P.; *et al.* Intestinal dysmotility syndromes following systemic infection by Flaviviruses. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 175, n. 5, p. 1198-1212.e12, 2018.

XIE, X. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, p. 4609–4622, 2013.

YOCKEY, L. J. *et al.* Vaginal exposure to Zika virus during pregnancy leads to fetal brain infection. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 166, n. 5, p. 1247-1256.e4, 2016.

YU, I. M. *et al.* Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, New York, v. 319, n. 5871, p. 1834–1837, 2008.

YU, J. *et al.* Effective suckling C57BL/6, Kunming, and BALB/c mouse models with remarkable neurological manifestation for Zika virus infection. **Viruses**, Basel, v. 9, n. 7, p. E165, 2017.

ZAMMARCHI, L.; TAPPE, D.; FORTUNA, C. *et al.* Zika virus infection in a traveller returning to Europe from Brazil, march 2015. **Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, Saint-Maurice, v. 20, n. 23, p. 21153, 2015.

ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZELLWEGER, R. M.; PRESTWOOD, T. R.; SHRESTA, S. Enhanced infection of liver sinusoidal endothelial cells in a mouse model of antibody-induced severe dengue disease. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 7, n. 2, p. 128-139, 2010.

ZHANG, F. *et al.* American strain of Zika virus causes more severe microcephaly than an old Asian strain in neonatal mice. **EBioMedicine**, Amsterdam, v. 25, p. 95-105, 2017.

ZHANG, X. *et al.* Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 20, p. 105–110, 2013.

ZHANG, Y. *et al.* Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 22, p. 2604–2613, 2003.

ZMURKO, J. *et al.* The viral polymerase inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine is a potent inhibitor of in vitro Zika virus replication and delays disease progression in a robust mouse infection model. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. e0004695, 10 May 2016.

ZMURKO, J. *et al.* Chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention. **Reviews in Medical Virology**, Chichester, v. 25, p. 205–223, 2015.

ZOU, J. *et al.* Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. **Journal of Virology**, Washington, v. 89, p. 3455–3470, 2015.

ANEXO A - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

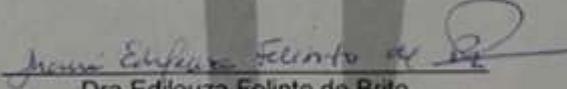
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado “Desenvolvimento de Modelos Experimentais e Estratégias Profilático-Terapêuticas Contra o Vírus da Zika” protocolado sob nº 124/2017 pelo (a) pesquisador (a) **Lindomar José Pena** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 12 de abril de 2022 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE. É responsabilidade do coordenador do projeto notificar à CEUA de quaisquer alterações em relação ao projeto. O coordenador concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo heterogênico (Swiss Webster)	120 (20 gr/ 6 semanas/ fêmeas)
Camundongo heterogênico (Swiss Webster)	70 (15 gr/3 semanas/fêmeas)
Camundongo heterogênico (Swiss Webster)	88 (20 gr/4-6 semanas/fêmeas)
Camundongo isogênico (A129)	141 (20 gr/ 4-6 semanas/fêmeas)
Total	419

Recife (PE, Brasil), 12 de abril de 2018


 Dra Edileuza Felinto de Brito
 Vice-Coordenadora CEUA/IAM

Maria Edileuza Felinto de Brito
 Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no
 Uso de Animais do IAM/Fiocruz-PE
 Mat. Sign: 0464741
 E-mail: britomaf@ioc.fiocruz.br

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
 www.cogaam.fiocruz.br

ANEXO B – RESUMO APRESENTADO NO CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado: **Utilização da técnica de infecção intracerebral em camundongos para condução de estudos de neuropatogênese causada pelo vírus Zika**, de autoria de **Carlos Ralph Batista Lins; Rafael Borges Rosa; Vanessa Alessandra de Barros Portela; Clintiano da Silva Curvêlo; Bárbara Nayane Rosário Fernandes de SOUZA; Lindomar José Pena**, orientado por Lindomar José Pena, foi apresentado na modalidade e-pôster, durante o **15º Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, 4º Encontro Latino Americano de Ciência em Animais de Laboratório e Reunião Anual do International Council On Laboratory Animal Science**, realizado de 16 a 19 de junho de 2018 no Centro de Eventos da Universidade Federal de Goiás em Goiânia/GO.

Goiânia, 19 de junho de 2018

Emitido em: 25 de junho de 2018



Autenticação
web.eventogyn.com.br/event/sbcal2018/certificate
Código de Segurança: 179.005.801.238

Ekaterina

Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenko Rivera
Presidente do SBCAL 2018

PATROCÍNIO OURO



REALIZAÇÃO



APOIO



ORGANIZAÇÃO

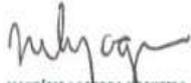


ANEXO C – RESUMO APRESENTADO NO XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA



We certify that the work entitled
USE OF THE TECHNIQUE OF INTRACEREBRAL INFECTION IN MICE TO CONDUCT STUDIES OF NEUROPATHOGENESIS CAUSED BY CANINE DISTEMPER VIRUS
 authored by
VANESSA ALESSANDRA DE BARROS PORTELA , RAFAEL BORGES ROSA, EMILENE FERREIRA DE CASTRO, LINDOMAR JOSÉ PENA, RITA DE CÁSSIA CARVALHO MAIA
 was presented in the **Poster Session** during the **XXIX BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY & XIII MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY**,
 held from October 17 to 21, 2018 in Gramado, RS, Brazil.

Gramado, October 21, 2018.


MAURÍCIO LACERDA NOGUEIRA
 PRESIDENT OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR VIROLOGY


FERNANDO ROSADO SPILKI
 PRESIDENT OF THE ORGANIZING COMMITTEE



CERTIFICATE

