

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

WELLINGTON DE ALMEIDA

**INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS NA PROLE DE RATAS
SUBMETIDAS À INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA DURANTE O PERÍODO
GESTACIONAL**

PORTO ALEGRE

2023

WELLINGTON DE ALMEIDA

**INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS NA PROLE DE RATAS
SUBMETIDAS À INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA DURANTE O PERÍODO
GESTACIONAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Neurociências.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Lenir Orlandi Pereira Silva

PORTO ALEGRE

2023



UFRGS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

ATA DE DEFESA DE TESE DOUTORADO DE
WELLINGTON DE ALMEIDA
NÚMERO 109

Aos dezoito dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e três, na Sala 601 do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em formato híbrido, realizou-se a defesa de Tese de Doutorado de **Wellington de Almeida**, intitulada: "Investigação de alterações neurológicas na prole de ratas submetidas à infecção pelo vírus Zika durante o período gestacional", sob orientação da Dra. Lenir Orlandi Pereira Silva, apresentada de acordo com o artigo 41 do Regimento do Programa. Às quatorze horas, o Dr. André Quincozes dos Santos, representando a Comissão Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Neurociências, abriu os trabalhos apresentando ao público presente os membros da Banca Examinadora, e logo após, passou a coordenação dos trabalhos à orientadora, Dra. Lenir Orlandi Pereira Silva, que brevemente saudou os presentes e de imediato, passou a palavra ao doutorando Wellington de Almeida para que apresentasse seu trabalho de Tese de Doutorado. Após a apresentação do trabalho, a Dra. Lenir Orlandi Pereira Silva instalou a banca e deu início à etapa de arguição ao doutorando, começando pela Dra. Julia Helena Rosauo Clarke (do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro). A seguir, fez uso da palavra o Dr. Daniel Rodrigo Marinowic (da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) e, por fim, argumentou o Dr. André Quincozes dos Santos (do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Encerrada a arguição, a Dra. Lenir

Orlandi Pereira Silva devolveu a coordenação dos trabalhos à representante do Programa de Pós-Graduação em Neurociências a o Dr. André Quincozes dos Santos. Os membros da Banca Examinadora reuniram-se, em sessão secreta, deliberaram sobre o desempenho do aluno e emitiram seus pareceres. Logo após, na presença de todos os participantes, foram promulgados os pareceres, a saber: Dra. Julia Helena Rosauo Clarke, parecer final: Aprovado; Dr. Daniel Rodrigo Marinowic, parecer final: Aprovado; Dr. André Quincozes dos Santos, parecer final: Aprovado. Sendo assim, o candidato foi Aprovado fazendo jus ao grau de **DOUTOR** em Neurociências. Por fim, o Dr. André Quincozes dos Santos encerrou os trabalhos, dos quais foi lavrada presente ata, que será assinada pelos membros da banca examinadora e pelo representante do Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Dra. Lenir Orlandi Pereira Silva
Orientadora

gov.br

Documento assinado digitalmente
JULIA HELENA ROSAURO CLARKE
Data: 29/08/2023 17:24:56-0380
Verifique em <https://validar.j5.gov.br>

Dra. Julia Helena Rosauo Clarke
Membro da Banca

Dr. Daniel Rodrigo Marinowic
Membro da Banca

Dr. André Quincozes dos Santos
Membro da Banca

Dr. André Quincozes dos Santos
Membro da Comissão Coordenadora do Programa
de Pós Graduação em Neurociências/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e a minha irmã pelos ensinamentos, pelo apoio incondicional e pela compreensão. O desenvolvimento da minha pós-graduação exigiu uma grande mudança para todos nós, durante este período vocês sempre tiveram palavras e gestos de carinho e mesmo morando em outro estado, se fizeram presentes em todos os momentos.

Agradeço a minha esposa por todo o apoio. Seu exemplo de dedicação e empenho me motivam a continuar, mesmo durante os dias mais difíceis. Você tem um papel fundamental na conclusão desta tese. Agradeço a amizade, o companheirismo, a sinceridade e o amor que compartilhamos. Sou muito feliz e grato por estar contigo e pela linda família que estamos construindo juntos.

Agradeço à minha orientadora pela oportunidade e aos colegas de laboratório pela parceria e auxílio no desenvolvimento deste estudo.

Agradeço aos colaboradores que apoiaram a realização deste projeto: Prof.^o Paulo, Prof.^a Ângela, Patrícia, Fernanda Marques, Thais e Ana Paula.

Obrigado ao CREAL e a toda equipe de funcionários pelo trabalho de excelência realizado. Foram mobilizados inúmeros recursos pessoais e materiais deste centro para que este trabalho pudesse ser desenvolvido. Agradeço especialmente à Dr.^a Fernanda pelo assessoramento e dedicação que possibilitaram o desenvolvimento do meu projeto.

Agradeço ao ICBS pelo apoio e por ter dedicado recursos financeiros para a compra de equipamentos que viabilizaram não somente este projeto, mas também todos os projetos NB-2 que continuarão sendo desenvolvidos no CREAL.

Obrigado ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste estudo.

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é um vírus transmitido por artrópodes (arbovírus) pertencente à família *flaviviridae* e gênero *flavivirus*. Foram relatadas complicações neurológicas graves e o surgimento de um aumento dramático nas malformações congênitas associadas ao ZIKV no Brasil entre os anos de 2014 e 2015. No entanto, os impactos relacionados ao neurodesenvolvimento causados em decorrência da infecção gestacional pelo ZIKV ainda não estão completamente esclarecidos, reforçando fortemente o apelo à necessidade de desenvolver estudos que busquem identificar e caracterizar alterações resultantes da infecção pelo ZIKV durante a gestação. Neste sentido, este trabalho apresenta um modelo de infecção congênita pelo ZIKV em ratos *Wistar* imunocompetentes e um estudo de revisão da literatura sobre a síndrome congênita causada pelo ZIKV. No modelo experimental proposto, a infecção foi realizada no 9º dia embrionário (E9) utilizando 1×10^6 unidade formadora de placa (do inglês: *plaque-forming unit* - PFU) mL^{-1} . A replicação viral ativa foi observada através do ensaio de placa realizado 24 horas após a infecção, identificando a presença do vírus no baço e cornos uterinos das fêmeas infectadas e nos fetos. Observamos deficiências nos marcos do neurodesenvolvimento em filhotes que sofreram infecção congênita por ZIKV. Ainda, no 22º dia pós-natal (DPN), foram detectadas alterações nas proteínas da barreira hematoencefálica no hipocampo com redução na quantidade das proteínas de β -catenina, ocludina e conexina-43. Além disso, foi identificado desequilíbrio redox com redução da atividade da enzima superóxido desmutase (SOD) no hipocampo e no córtex, redução no conteúdo de sulfidrila no hipocampo e redução dos níveis corticais de 2, 7 diclorofluoresceína diacetato (DCF), sem redução do número de neurônios nessas estruturas. Assim, mesmo sem o fenótipo semelhante à microcefalia nos filhotes, a infecção congênita pelo ZIKV causou atraso no desenvolvimento associada à danos na barreira hematoencefálica e distúrbios de estresse oxidativo nos animais. Ainda, o estudo de revisão desenvolvido contribuiu para a melhor compreensão da síndrome congênita causada pelo ZIKV. Desta forma, os dados aqui apresentados destacam o impacto múltiplo da infecção congênita pelo ZIKV no neurodesenvolvimento, o que reforça a continuidade dos estudos para entender o espectro desse comprometimento e a busca para fornecer subsídios visando o desenvolvimento de tratamentos para pacientes acometidos pela infecção congênita do ZIKV.

Palavras-chave: Gestação, Infecção gestacional, Neurodesenvolvimento, vírus Zika.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus (arbovirus) classified into family *flaviviridae* genus *flavivirus*. Severe neurological complications and the emergence of a dramatic increase in ZIKV-associated birth defects have been reported in Brazil. However, the impacts related to neurodevelopment caused as a result of gestational ZIKV infection are not yet fully understood, strongly reinforcing the call for the need to develop studies that seek to identify and characterize alterations resulting from ZIKV infection during pregnancy. In this sense, this work presents a model of ZIKV congenital infection in immunocompetent *Wistar* rats and a review on the ZIKV congenital syndrome. In the proposed animal model, the infection was performed on the 9th embryonic day (E9) using 1×10^6 plaque-forming unit (PFU) mL^{-1} . Active viral replication was observed on the plaque assay performed 24 hours after infection, identifying the virus presence in the spleen and uterine horns of infected females and their fetuses. We observed neurodevelopmental milestones deficiencies in puppies that suffered ZIKV congenital infection. Furthermore, on the 22nd postnatal day, changes were detected in the blood-brain barrier proteins in the hippocampus with a reduction of β -catenin, occludin and connexin-43 proteins. In addition, an oxidative state imbalance was identified with superoxide dismutase (SOD) activity reduction in the hippocampus and cortex, a reduction in the hippocampal sulfhydryl content and a reduction in the cortical levels of 2, 7 dichlorofluorescein diacetate (DCF), without neuronal reduction in these structures. Thus, even without the microcephaly-like phenotype in the pups, congenital ZIKV infection caused developmental delay associated with blood-brain barrier damage and oxidative stress disorders in the animals. Furthermore, the review study presented contributes to a better understanding of the ZIKV congenital syndrome. Thus, data presented here highlight the multiple impact of congenital ZIKV infection on neurodevelopment, which reinforces the continuity of studies to understand the spectrum of this impairment and the quest to provide subsidies aimed at developing treatments for patients affected by congenital ZIKV infection.

Keywords: Pregnancy, Gestational infection, Neurodevelopment, Zika virus.

LISTA DE FIGURAS

Tese

Figura 1 - Estrutura genômica do vírus Zika.

Figura 2 - Principais vias de transmissão do vírus Zika.

Figura 3 - Mapa global do potencial de propagação do vírus Zika.

Figura 4 - Arranjo estrutural do vírus Zika.

Figura 5 - Representação esquemática da estrutura da barreira hematoencefálica

Artigo

Figura 1 - Linha do tempo.

Figura 2 – Análises do comportamento olfatório e endireitamento.

Figura 3 – Imagens representativas do encéfalo coradas com azul de toluidina.

Figura 4 - Quantificação de proteínas da barreira hematoencefálica na região do hipocampo.

Figura 5 - Quantificação de proteínas da barreira hematoencefálica na região do córtex.

Figura 6 – Avaliação do estado oxidativo no córtex.

Figura 7 – Avaliação do estado oxidativo no hipocampo.

Apêndice

Figura 1 – Número de implantações uterinas identificadas nas fêmeas

Figura 2 – Gráfico referente ao ganho de peso das fêmeas durante o período gestacional

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1 – Morfometria dos filhotes vinte e quatro horas após o nascimento.

Tabela 2 – Análise do dia de aparecimento dos reflexos neurológicos.

Tabela 3 – Reflexo de aversão à queda.

Tabela 4 – Análise da marcha.

Tabela 5 – Reflexo de geotaxia negativa.

Tabela 6 – Quantificação neuronal no hipocampo e córtex.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AHU - Unidade de tratamento do ar - (do inglês: *Air Handling Unit*)
- BHE - Barreira hematoencefálica
- CAT - Catalase
- CDC - Centro de controle e prevenção de doenças - (do inglês: *Center for Disease Control and Prevention*)
- CLR - Receptores de lectina tipo C - (do inglês: *C-Type Lectin Receptors*)
- CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CSB - Cabine de segurança biológica
- DCF - 2, 7 diclorofluoresceína diacetato
- DC-SIGN - Molécula não integrina, que capta a molécula de adesão intercelular 3 e específica das células dendríticas - (do inglês: *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*)
- DENV - Vírus da dengue - (do inglês: *Dengue virus*)
- DPN - Dia pós-natal
- ERO - Espécies reativas de oxigênio
- fosfo-TBK1 - Cinase de ligação a TANK 1 - (do inglês: *TANK-binding kinase 1*)
- GAGs - Glicosaminoglicanos
- hBLECs - Células humanas endoteliais semelhantes ao cérebro (do inglês: *human brain-like endothelial cells*)
- HEPA - Filtro de absorção de partículas de alta eficiência - (do inglês: *high-efficiency particulate absorbing filter*)
- HepG2 - Linhagem celular de carcinoma hepático humano - (do inglês: *hepatocellular carcinoma cell line*)
- hNPCs - Células progenitoras neurais humanas - (do inglês: *human neural progenitor cells*)
- IFN - Interferon
- IVC - Caixas individuais ventiladas - (do inglês: *Individually Ventilated Cages*)
- LOX - Lisil oxidase
- NB2 - Nível 2 de biossegurança
- NPCs - Células progenitoras neurais - (do inglês: *neural progenitor cells*)
- PCR - Reação em cadeia da polimerase - (do inglês: *polymerase chain reaction*)
- PFU - Unidade formadora de placa (do inglês: *plaque-forming unit*)
- RGC - Células da glia radial - (do inglês: *Radial Glia Cell*)

RN - Resolução normativa

RNA - Ácido ribonucleico – (do inglês: *ribonucleic acid*)

ERO - Espécies reativas de oxigênio

SNC - Sistema nervoso central

SOD - Superóxido desmutase

U87MG - Linhagem celular de glioblastoma humano - (do inglês: *Uppsala 87 Malignant Glioma*)

WNV - Vírus do Nilo Ocidental - (do inglês: *West Nile virus*)

YFV - Vírus da febre amarela - (do inglês: *Yellow fever virus*)

ZIKV - Vírus Zika

ZO-1 - Zona de oclusão - (do latim: *Zonula occludens*)

SUMÁRIO

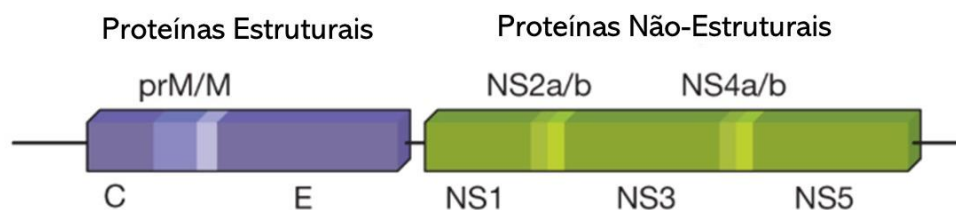
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Histórico e transmissão.....	13
1.2 processo de infecção e consequências.....	16
1.3 modelos animais para o estudo da infecção gestacional por zikv.....	20
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
4 CAPÍTULO I - Projeto Piloto.....	26
5 CAPÍTULO II. Zika Virus affects neurobehavioral development, and causes oxidative stress associated to blood-brain barrier disruption in a rat model of congenital infection.....	28
6 CAPÍTULO III. Pathophysiology of congenital Zika Virus infection.....	42
7 DISCUSSÃO.....	65
8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE I.....	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO E TRANSMISSÃO

O vírus Zika (ZIKV) foi identificado e isolado pela primeira vez no final da década de 1940 pelo virologista George W. Dick e seus colegas da Fundação Rockefeller. Ao monitorar macacos *rhesus* na floresta Zika de Uganda, para investigar sinais de doenças transmitidas por mosquitos, os pesquisadores coletaram amostras de sangue de um macaco febril e descobriram um vírus previamente desconhecido; os pesquisadores então deram a esse vírus o nome da região onde foi realizada a descoberta (BECKER, 2016; DICK, 1952). O ZIKV é um membro do gênero *flavivírus*, família *flaviviridae*, que compreende uma grande família de vírus patogênicos e está intimamente relacionado a vários outros arbovírus, incluindo vírus da dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV) e vírus do Nilo Ocidental (WNV) (STATES et al., 2016). Estruturalmente o vírus é relativamente simples, sendo composto por proteínas estruturais e não estruturais que são sintetizadas no retículo endoplasmático da célula hospedeira (figura 1) (PIERSON; DIAMOND, 2018).

Figura 1. Estrutura genômica do vírus Zika



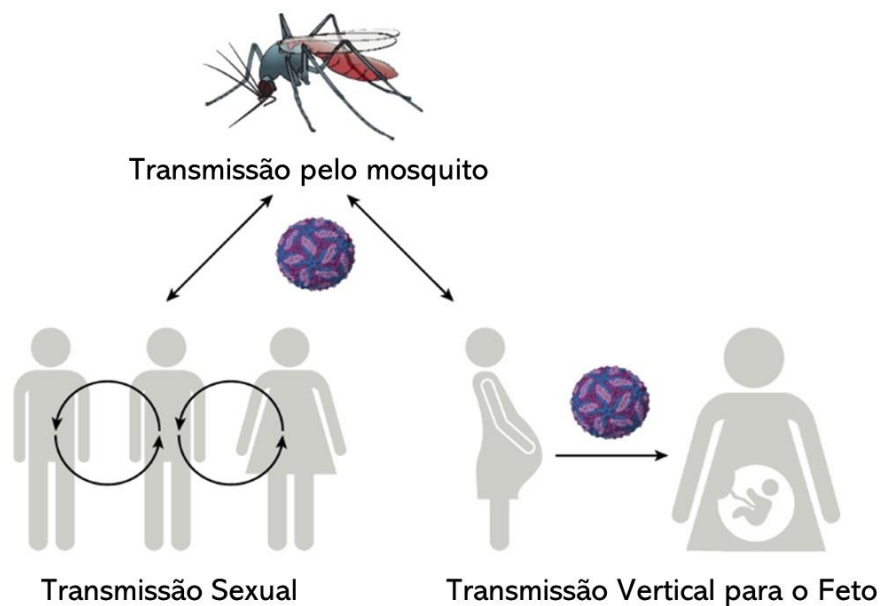
Os flavivírus codificam um único quadro de leitura aberta que é traduzido no retículo endoplasmático do hospedeiro em uma poli proteína, que é subsequentemente clivada por proteases virais e da célula hospedeira. Esse processamento resulta em dez proteínas funcionais, incluindo as três proteínas estruturais, C, prM e E, e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2 a/b, NS3, NS4 a/b e NS5. Adaptado de (PIERSON; DIAMOND, 2018). The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature* 560, 573–581. (Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0446-y>). © Springer Nature.

Assim como outros *flavivírus*, o ZIKV é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, que possuem distribuição global, sendo a maioria das espécies destes mosquitos encontrada em regiões tropicais e subtropicais, que apresentam as condições ideais para o seu desenvolvimento e proliferação (PLOURDE; BLOCH, 2016). O período de incubação do vírus em humanos

desde a picada do mosquito até o início dos sintomas da infecção é de 3 a 12 dias, sendo a infecção assintomática em cerca de 80% dos casos (IOOS et al., 2014).

A transmissão pelo vetor é a principal forma de contaminação pelo ZIKV, no entanto, já foi relatada na literatura a transmissão sexual do ZIKV (figura 2) (DAVIDSON et al., 2016; D'ORTENZIO et al., 2016; VENTURI et al., 2016), sendo também identificada a persistência viral no sêmen (ATKINSON et al., 2016; MANSUY et al., 2016). As implicações para a saúde pública da transmissão sexual são de grande alcance, já que esse modo de transmissão permite que o vírus seja disseminado em áreas geográficas mais distantes do que a capacidade de alcance do seu vetor (TANG et al., 2016b).

Figura 2. Principais vias de transmissão do vírus Zika

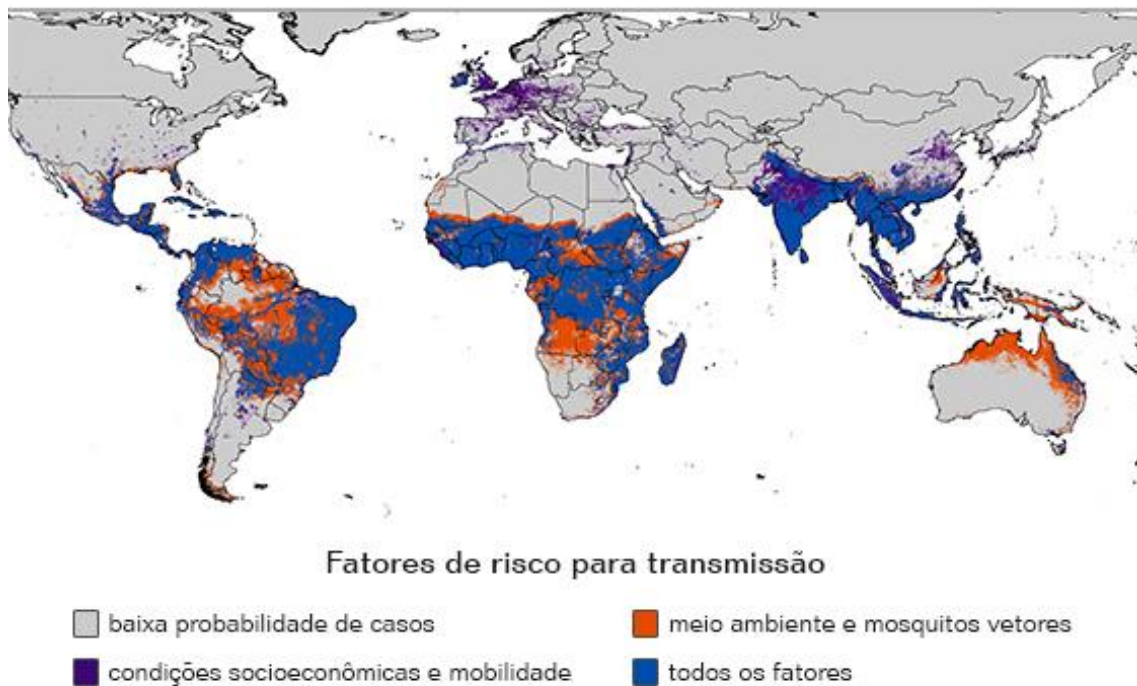


Adaptado de (PIERSON; DIAMOND, 2018). The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature* 560, 573–581. (Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0446-y>). © Springer Nature.

A primeira infecção identificada em humanos causada pelo ZIKV ocorreu na Nigéria em 1954 (MACNAMARA, 1954). A semelhança com outras infecções por arbovírus (como a dengue) pode confundir o diagnóstico. Os sintomas relatados incluem erupção cutânea, febre, artralgia, mialgia, fadiga, dor de cabeça e conjuntivite (PLOURDE; BLOCH, 2016). Em 2007,

através da transmissão por mosquitos *Aedes aegypti*, o ZIKV causou a primeira epidemia expressiva na ilha Yap, território da Micronésia (CUGOLA et al., 2016). Estima-se que o vírus tenha chegado ao Brasil em 2013 e posteriormente se espalhado para outros países da América do Sul e Central, mostrando um expressivo potencial de disseminação do vírus (figura 3) (FARIA et al., 2016). Um grande aumento nos casos de infecção por ZIKV foi inicialmente identificado em 2015, além disso, foi observado um aumento da incidência de casos de microcefalia no nordeste brasileiro, estabelecendo uma correlação temporal com o aumento nos casos de infecção pelo ZIKV (BRASIL et al., 2016; FRANÇA et al., 2016; KLEBER DE OLIVEIRA et al., 2016).

Figura 3. Mapa global do potencial de propagação do vírus Zika



Fonte: Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em: (<https://rededengue.fiocruz.br/noticias/536-motores-da-disseminacao-do-virus-zika-no-mundo>).

A confirmação da relação causal entre a infecção por ZIKV e desfechos adversos da gravidez (por exemplo, síndrome congênita do ZIKV) foi estabelecida em humanos e em modelos animais após infecção experimental de roedores e de primatas não humanos (ADAMS WALDORF et al., 2016; CUGOLA et al., 2016; MINER; DIAMOND, 2016; SZABA et al., 2018; WU et al., 2016). Experimentos têm demonstrado que o ZIKV causa grandes prejuízos ao neurodesenvolvimento, estando associado a malformações congênitas e a formação de

calcificações intracerebrais, além de causar outras doenças neurológicas graves, como a síndrome de Guillain-Barré em adultos (CUGOLA et al., 2016; DE FATIMA VASCO ARAGAO et al., 2016).

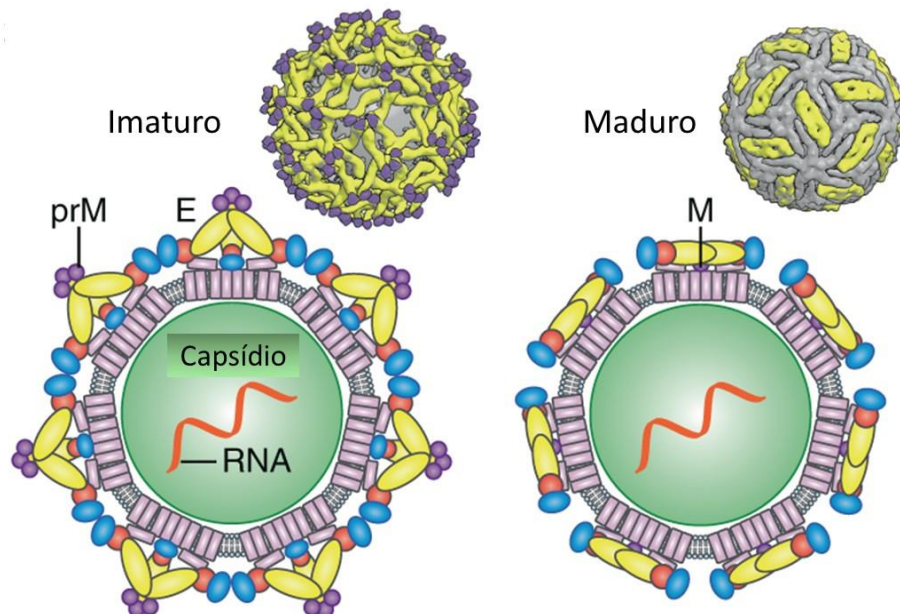
Após infecção gestacional o vírus pode passar pela placenta e chegar ao tecido nervoso fetal em desenvolvimento. Uma hipótese para a chegada do vírus ao sistema nervoso central (SNC) do feto foi levantada por um estudo que mostrou a adesão do ZIKV aos monócitos, essa adesão permitiria a passagem do vírus pelo endotélio e a disseminação do vírus no sistema nervoso do feto (AYALA-NUNEZ et al., 2019).

Outra possibilidade importante para a chegada do vírus no sistema nervoso fetal foi apresentada em um trabalho que revelou um papel crítico do colágeno e de proteínas da matriz extracelular nesse processo (AGUIAR et al., 2020). Neste caso, a infecção por ZIKV foi associada à expressão reduzida dos genes que codificam o colágeno, o que pode levar a um defeito de vascularização, possibilitando a passagem do vírus pela barreira hematoencefálica (BHE) com consequente infecção das células nervosas (AGUIAR et al., 2020).

1.2 PROCESSO DE INFECÇÃO E CONSEQUÊNCIAS

O ZIKV pode infectar diretamente as células da glia radial (ONORATI et al., 2016) e os progenitores neurais (ROSA-FERNANDES et al., 2019). O processo de entrada do ZIKV nas células alvo é mediado por N-glicanos ligados à proteína viral E (HASAN et al., 2017) (a proteína E e o arranjo estrutural do vírus são mostrados na figura 4). A infecção pode promover morte e consequente redução na quantidade destas células, além disso, a infecção das células da glia radial prejudica a migração de neurônios para o córtex podendo levar também a desorganização cortical (WU et al., 2016).

Figura 4. Arranjo estrutural do vírus Zika.



O arranjo distinto das proteínas E nas formas imatura (esquerda) e madura (direita) do vírion é representado. Adaptado de (PIERSON; DIAMOND, 2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol* 5, 796–812. (Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0446-y>). © Springer Nature.

Os neurônios, por sua vez, também podem ser diretamente infectados, essa infecção promove um quadro de hiperexcitabilidade, excitotoxicidade e morte neuronal (GABURRO et al., 2018). Como consequência direta e mais evidente da infecção por ZIKV, podemos observar uma redução geral na quantidade de células, principalmente no córtex; essa redução de células neurais ocasiona também redução no perímetro cefálico, levando ao quadro de microcefalia, que caracterizou muitos casos de infecção congênita durante a epidemia que ocorreu entre os anos de 2015 -2016.

A microcefalia, considerada inicialmente como a principal consequência associada a infecção gestacional pelo ZIKV, é uma anomalia congênita onde a cabeça da criança é menor em comparação a outras crianças do mesmo sexo, idade e etnia. Esta condição está associada a um elevado risco de atraso no desenvolvimento, incluindo deficiência intelectual e deficiências físicas, como auditiva e visual (DOLK, 1991; MORRIS et al., 2016). Ainda, outras condições, como a epilepsia, também podem estar presentes nestes pacientes (VON DER HAGEN et al., 2014).

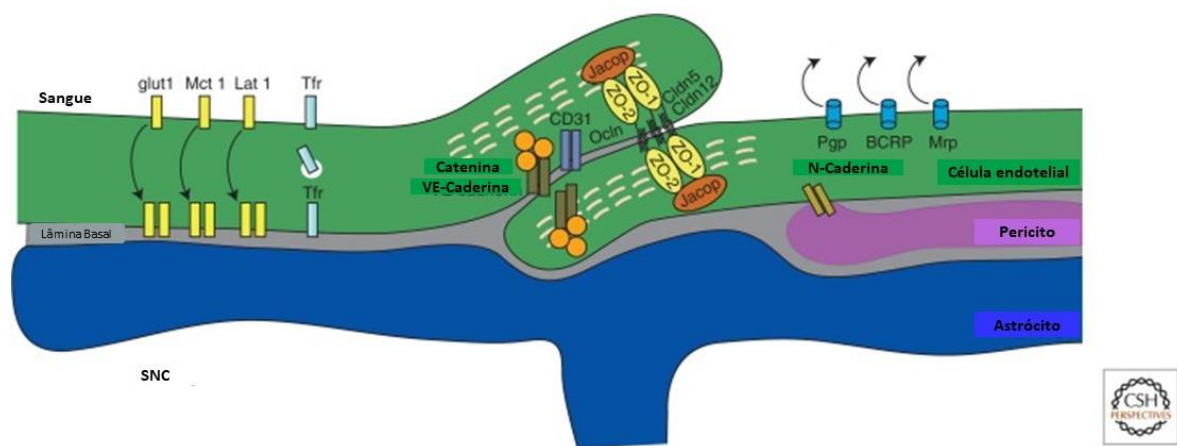
Apesar das evidências iniciais de que a microcefalia seria a principal consequência neurológica causada pela infecção, estudos recentes mostram que atrasos no neurodesenvolvimento podem ser observados em crianças vítimas de infecção congênita pelo ZIKV mesmo sem estas apresentarem microcefalia (SOBRAL DA SILVA et al., 2021). Desta forma, está ficando cada vez mais claro que a patogenicidade do ZIKV não se restringe aos danos observados logo após o nascimento e há evidências convincentes de impactos de longo prazo decorrentes desta infecção.

Um estudo *in vitro* realizado para avaliar como a infecção viral pode levar a alterações da função celular utilizando células U87-MG e HepG2 (linhagem celular de glioblastoma humano e carcinoma hepático humano, respectivamente) verificou que células infectadas com ZIKV apresentaram aumento em espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e aumento de produtos de carbonilação de proteínas, além de diminuição das atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase indicando alteração no estado oxidativo celular (ALMEIDA et al., 2020). Células progenitoras neurais humanas (hNPCs, do inglês - *human neural progenitor cells*) infectadas revelaram desregulação do ciclo celular e aumento da quantificação de caspase 3 com consequente morte celular (TANG et al., 2016).

Outra alteração identificada após a infecção pelo ZIKV ocorre na BHE, um importante mecanismo de proteção entre a circulação sistêmica e o tecido nervoso (CLÉ et al., 2020). A BHE é um termo usado para descrever as propriedades únicas da microvasculatura do SNC. Os vasos do SNC são do tipo não fenestrados contínuos, mas também contêm uma série de propriedades adicionais que lhes permitem regular firmemente o movimento de moléculas, íons e células entre o sangue e o SNC. Essa capacidade restritiva da barreira permite uma rígida regulação da homeostase do SNC, o que é crítico para permitir a função neuronal adequada, além de proteger o SNC de toxinas, patógenos, inflamação, lesões e doenças (figura 5). A perda de algumas ou a maioria dessas propriedades de barreira é um componente importante da patologia e progressão de doenças (DANEMAN; PRAT, 2015). A disfunção da BHE pode levar à desregulação iônica, alterações de sinalização celular, bem como à entrada de células e moléculas do sistema imunológico no SNC, processos que podem levar à disfunção e degeneração neuronal (OBERMEIER; DANEMAN; RANSOHOFF, 2013). Alterações na integridade da BHE causada após infecção por ZIKV foi observada em experimentos *in vitro* e *in vivo*, onde foi identificada alteração em sua permeabilidade (LEDA et al., 2019). No entanto, não está claro se essas mudanças são apenas transitórias ou também podem ser duradouras,

assim como não se conhece completamente a miríade de danos causados pela infecção nessa estrutura.

Figura 5. Representação esquemática da estrutura da barreira hematoencefálica



Representação esquemática da estrutura e das moléculas que compõe a barreira hematoencefálica. Adaptado de: (DANEMAN; PRAT, 2015). The blood-brain barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015 Jan 5;7(1): a020412 (Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>). Reproduzido com permissão. © Cold Spring Harbor Laboratory Press.

As alterações na BHE observadas após infecção por ZIKV também podem estar relacionadas com um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), ou supressão das defesas antioxidantes intracelulares (OBERMEIER; DANEMAN; RANSOHOFF, 2013; PUN; LU; MOOCHHALA, 2009). O desequilíbrio redox, pode causar danos generalizados nas células, que dependendo da extensão pode levar a morte celular (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Além disso, há estudos que mostram uma possível relação entre o aumento de ERO e consequente dano na BHE (OBERMEIER; DANEMAN; RANSOHOFF, 2013; PUN; LU; MOOCHHALA, 2009).

Além das consequências já citadas, alterações durante o período gestacional em humanos, como restrição do crescimento intrauterino, morte fetal e consequente aborto espontâneo, natimortalidade e distúrbios oculares também podem ocorrer como consequências da infecção por ZIKV (ALVARADO; SCHWARTZ, 2017; BRASIL et al., 2016; COYNE; LAZEAR, 2016).

1.3 MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA INFECÇÃO GESTACIONAL POR ZIKV

Modelos animais têm sido usados para avaliar a patogenicidade do ZIKV utilizando roedores. Devido à dificuldade em usar animais imunocompetentes, muitos estudos têm sido propostos com animais deficientes em interferon (IFN) (KUBLIN; WHITNEY, 2018). Estes estudos com animais imunossuprimidos, como camundongos A129 e AG129, foram cruciais para elucidar o impacto da transmissão vertical (VUE; TANG, 2021). Outros modelos animais propostos adotaram diferentes rotas de infecção, como a infecção intrauterina diretamente no cérebro dos roedores em desenvolvimento (ZHANG et al., 2016), ou ainda em alguns modelos os animais são infectados logo após o nascimento (LAZEAR et al., 2016; MINER et al., 2016). No entanto, estas rotas de infecção se distanciam do observado em humanos em relação a transmissão vertical.

Buscando propor um modelo onde há transmissão vertical do ZIKV, um estudo que utilizou fêmeas C57BL/6 prenhas infectadas por via intravenosa com ZIKV entre os dias 10-13 da gestação, identificou várias alterações nos encéfalos dos filhotes, incluindo vacúolos intranucleares e aspecto de núcleos "vazios" com marginações de cromatina nos neurônios. Além disso, também foi mostrado que ZIKV induziu apoptose e autofagia no tecido nervoso dos animais (CUGOLA *et al.*, 2016). Ainda, neste mesmo estudo foram infectados organoides cerebrais com ZIKV isolado no Brasil (ZIKVBR), e ZIKV isolado da África (ZIKVAF). Células TBR1 e CTIP2, que são subtipos de neurônios corticais das camadas V e VI, foram avaliadas e observou-se uma redução significativa nas células positivas a TBR1 nos organoides infectados com ZIKVBR 96 h pós-infecção, enquanto as células positivas para CTIP2 foram significativamente reduzidas em ambos os grupos infectados com ZIKVBR e ZIKVAF em avaliações realizadas no mesmo momento. Além da redução da população de neurônios corticais, uma diminuição significativa das células progenitoras dorsais do prosencéfalo foi observada após a infecção por ZIKV (CUGOLA *et al.*, 2016).

Miner et al. (2016) utilizou camundongos deficientes em receptores interferon tipo I e cruzou estes com animais tipo “selvagem” C57BL/6, o que segundo os autores, produziu fetos heterozigotos que se assemelham ao estado imunitário de fetos humanos. No sexto ou sétimo dia gestacional (E6.5 ou E7.5) as fêmeas foram inoculadas com o ZIKV por via subcutânea com injeções na pata do animal. A avaliação histopatológica demonstrou células apoptóticas abundantes dentro de múltiplas regiões no E13.5. Foi identificada apoptose em todo o mesencéfalo e região posterior do encéfalo dos animais infectados. Porém, as numerosas células apoptóticas juntamente com o neurotropismo estabelecido normalmente não permitiram saber se a apoptose é resultado apenas da infecção pelo vírus ou podem estar sendo causadas por uma resposta exacerbada do sistema imunológico (MINER *et al.*, 2016). Este trabalho mostra que ainda não está claro como ocorre o processo de morte celular no tecido nervoso em decorrência da infecção pelo ZIKV.

Em outro modelo animal que utilizou camundongos C57BL/6 imunocompetentes foram investigados os efeitos da infecção por ZIKV no desenvolvimento embrionário e suas consequências a longo prazo nos filhos de mães infectadas. Neste modelo a infecção foi realizada no E 5.5. Os resultados deste trabalho revelam que a exposição precoce ao ZIKV durante o período gestacional induz a ativação do sistema imunológico materno, que segundo os autores está associada a anormalidades fetais e morte na prole. Dentre as alterações observadas na prole estão a diminuição no volume total do encéfalo, alterações oftalmológicas, além de modificações na morfologia testicular e óssea. Os filhotes foram avaliados 12 semanas após o nascimento, evidenciando que as alterações decorrentes da infecção durante o período gestacional têm efeitos duradouros (CAMARGOS *et al.*, 2019).

Alterações patológicas na placenta e morte fetal também foram observadas em outro trabalho que utilizou camundongos C57BL/6 imunocompetentes. Neste modelo a exposição materna ao ZIKV no E 9.5 levou a graves alterações na placenta como hiperplasia de trofoblastos, necrose de células gigantes trofoblásticas na zona de junção e perda de vasos embrionários. Estas alterações placentárias, consequentemente levaram a morte e reabsorção de vários embriões e dentre os que sobreviveram foi observado restrição de crescimento intrauterino, malformações fetais, bem como redução significativa de peso. Tais alterações evidenciadas não tiveram uma relação direta com os níveis de RNA viral quantificados nos tecidos materno, placentário ou embrionário. Isso mostra que mesmo sem a confirmação da infecção através da presença do RNA viral, diversas alterações placentárias podem ser

observadas, levando a inúmeros resultados adversos no período gestacional em camundongos (SZABA *et al.*, 2018).

Ainda, outras alterações como disrafia espinal, hidrocefalia, artrogripose, hemorragia intra-amniótica e edema generalizado, também foram observadas em outro trabalho com a mesma linhagem de camundongos infectados durante o período gestacional nos dias E 5.5, E 7.5 ou E 9.5 (XAVIER-NETO *et al.*, 2017). Neste estudo as anormalidades fetais também foram correlacionadas com danos à placenta, particularmente à camada labiríntica, sugerindo que as alterações circulatórias placentárias também são importantes fatores que levam aos fenótipos alterados observados nos filhotes (XAVIER-NETO *et al.*, 2017).

Alterações na coordenação motora também foram observadas em camundongos C57BL/6 que foram inoculados com ZIKV diretamente no líquido amniótico. Além disso, o RNA viral foi detectado em encéfalos fetais ao nascimento e no oitavo dia pós-natal, indicando que a infecção viral continuou durante o desenvolvimento pós-natal neste modelo (CUI *et al.*, 2017). Em contraste, a maioria dos bebês humanos nascidos de mães que foram expostas ao ZIKV durante o primeiro trimestre da gravidez estava livre de RNA viral e pareciam saudáveis ao nascer (JOHANSSON *et al.*, 2016; REYNOLDS *et al.*, 2017). No entanto, considerando os efeitos graves da infecção por ZIKV nas células progenitoras neurais, é possível que mesmo uma infecção congênita transitória por ZIKV durante o desenvolvimento embrionário possa resultar em déficits de longo prazo durante o desenvolvimento pós-natal, mesmo se nenhum sintoma proeminente for observado ao nascimento (PAUL *et al.*, 2018).

Em um estudo com camundongos imunocompetentes, a infecção retrobulbar pelo ZIKV em fêmeas prenhas não causou fenótipos evidentes ao nascimento dos filhotes, mas promoveu um aumento no número de neurônios imaturos no hipocampo. Os machos também mostraram níveis aumentados de testosterona associados a aprendizado e memória prejudicados (STANELLE-BERTRAM *et al.*, 2018).

Além dos modelos que utilizam camundongos, um interessante modelo para avaliação da infecção gestacional por ZIKV em ratos foi proposto. Neste modelo foi realizada a inoculação viral em fêmeas prenhas imunocompetentes no E18 e foram identificadas morte celular neonatal e atrofia cortical/hipocampal (SHERER *et al.*, 2019). Recentemente, outro estudo que utilizou o mesmo modelo relata que a infecção pré-natal em E18 produziu aumento transitório e diminuição de área em algumas regiões do hipocampo, mostrando uma alteração na trajetória de desenvolvimento típica dos encéfalos neonatais (PATEL *et al.*, 2021). Em outro estudo ainda com o mesmo modelo animal, foram identificadas alterações motoras em

avaliações realizadas na idade adulta, indicando a ocorrência de distúrbios de longo prazo (SHERER et al., 2021).

A partir dos estudos em modelos animais pode-se observar que déficits duradouros podem estar presentes, além disso, um estudo clínico recente realizado com mães que tiveram infecção por ZIKV durante a gravidez observou que mesmo em crianças assintomáticas ao nascer foi observado o surgimento de pelo menos um marcador de atraso no desenvolvimento em avaliações realizadas cerca de dois anos após o nascimento (MAIA et al., 2021). As avaliações do neurodesenvolvimento permitem identificar precocemente o atraso no desenvolvimento infantil, sendo essencial para a atenção primária à saúde (LIU et al., 2010; SANDLER et al., 2001). Do ponto de vista translacional, as avaliações do neurodesenvolvimento (ou marcos do desenvolvimento) de roedores permitem inferir sobre o desenvolvimento sensório-motor e cognitivo dos animais (SMIRNOV; SITNIKOVA, 2019), sendo um indicativo de distúrbios do desenvolvimento na idade adulta (NGUYEN; ARMSTRONG; YAGER, 2017).

Está se tornando cada vez mais claro que a patogenicidade do ZIKV não se restringe às condições supracitadas. De fato, a infecção pelo ZIKV mostra muitas semelhanças com as infecções perinatais causadas pelos patógenos conhecidos como "TORCH" que incluem principalmente (*Toxoplasma gondii*, rubéola, citomegalovírus, *herpes simplex*), mas também podem incluir sífilis, varicela-zóster e parvovírus B19. Esta semelhança se dá especialmente na forma como o ZIKV afeta os embriões e fetos, levando a graves prejuízos pós-natais (COYNE; LAZEAR, 2016; XAVIER-NETO et al., 2017). Estas observações aumentam as preocupações com a saúde pública, uma vez que há anormalidades do desenvolvimento que ainda não foram bem caracterizadas, além disso, modelos robustos que avaliem os danos decorrentes da síndrome congênita ainda estão em fase de estabelecimento, portanto, a infecção pelo ZIKV pode ter um impacto ainda maior do que o já identificado.

A descrição fisiopatológica da síndrome congênita causada pelo ZIKV não foi completamente situada, o que mostra uma clara demanda pelo desenvolvimento de mais estudos com animais imunocompetentes para entender o estabelecimento da resposta imune, as incapacidades de longo prazo e para testar o desenvolvimento de vacinas e tratamentos, além de auxiliar na busca por biomarcadores que atuem na detecção precoce da infecção.

2 JUSTIFICATIVA

Ainda que os casos de microcefalia sejam alarmantes, alterações neurológicas também foram identificadas em filhos de mães que tiveram infecção viral na gestação, mesmo sem a diminuição do perímetro cefálico (FRANÇA et al., 2016). Além disso, recentemente já foi identificada a circulação do ZIKV em gestantes assintomáticas na região Nordeste do Brasil (BRANCO et al., 2021). Não obstante, há evidências de que mesmo em gestantes assintomáticas, o neurodesenvolvimento da prole pode estar comprometido (SHAPIRO-MENDOZA et al., 2017). Assim, depreende-se a hipótese de que tais eventos relacionados à infecção congênita pelo ZIKV podem ter um impacto maior do que hoje identificamos. Muitas crianças que não tiveram o diagnóstico de alterações durante o nascimento ou cujas mães tiveram infecção assintomática podem vir a apresentar déficits tardiamente, o que prejudica a janela ideal para início de intervenções e pode exercer pressão extra sobre o sistema de saúde.

Desta forma, uma importante contribuição pode ser dada por este trabalho, no sentido de propor um modelo de infecção congênita por ZIKV em ratos *Wistar* imunocompetentes, conhecer os efeitos desta infecção sobre a função do sistema nervoso da prole, identificar aspectos fisiopatológicos e alterações preditivas nos animais e assim contribuir para o estabelecimento de um modelo animal que proporcione uma maior base de conhecimento sobre a síndrome congênita, pavimentando o caminho para a busca de alternativas preventivas e terapêuticas que possam auxiliar no controle desta doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as consequências sobre o desenvolvimento neurológico da prole de ratas que sofreram a infecção pelo ZIKV durante a gestação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Padronizar o protocolo de infecção gestacional experimental com o ZIKV em ratos:

Ratas *Wistar* prenhas foram submetidas a infecções com diferentes doses e vias de infecção e avaliadas para a confirmação da infecção congênita;

b) Análise dos marcos do desenvolvimento: O desenvolvimento neurológico foi avaliado por meio da observação dos marcos de desenvolvimento, que inclui ocorrência de características físicas, sinais e reflexos no período neonatal.

c) Características morfológicas e bioquímicas do encéfalo: No vigésimo segundo dia pós-natal foram realizadas no hipocampo e córtex: a análise de densidade neural; a quantificação de proteínas componentes da barreira hematoencefálica e a avaliação do estado oxidativo.

d) Revisão da literatura sobre a fisiopatologia da infecção congênita causada pelo ZIKV:

Descrever a fisiopatologia conhecida da infecção congênita pelo ZIKV.

4 CAPÍTULO I - Projeto Piloto

Um projeto piloto foi desenvolvido para definição da melhor rota de infecção e dose viral utilizada neste estudo.

Seguindo as recomendações de biossegurança para agentes biológicos classificados no nível 2, para este experimento, os animais ficaram em caixas de alojamento individuais ventiladas (IVC - do inglês, *Individually Ventilated Cages*), com 904 cm² de área e 18 cm de altura (Tecniplast®, Buguggiate, Italy), acopladas a unidades de ventilação e tratamento de ar (AHU – do inglês, *Air Handling Unit*) (Tecniplast®, Buguggiate, Italy). Ratas prenhas foram aleatoriamente separadas em 7 grupos, sendo cada grupo exposto a um dos seguintes protocolos de infecção pelo ZIKV isolado no Brasil.

Grupo 1: submetido à administração via endovenosa na veia caudal de 1×10^4 unidade formadora de placa (do inglês: *plaque-forming unit* - PFU mL⁻¹);

Grupo 2 submetido à administração endovenosa na veia caudal de 1×10^5 unidade formadora de placa (do inglês: *plaque-forming unit* - PFU mL⁻¹);

Grupo 3: submetido à administração endovenosa na veia caudal de 1×10^6 unidade formadora de placa (do inglês: *plaque-forming unit* - PFU mL⁻¹);

Grupo 4: submetido à administração intravaginal de 1×10^4 unidade formadora de placa (do inglês: *plaque-forming unit* - PFU mL⁻¹);

Grupo 5: submetido à administração intravaginal de 1×10^5 unidade formadora de placa (do inglês: *plaque-forming unit* - PFU mL⁻¹);

Grupo 6: submetido à administração intravaginal de 1×10^6 unidade formadora de placa (do inglês: *plaque-forming unit* - PFU mL⁻¹);

Grupo 7: submetido à administração intraperitoneal (i.p) de 1×10^6 unidade formadora de placa (do inglês: *plaque-forming unit* - PFU mL⁻¹).

Para a confirmação da infecção foi realizada a avaliação da carga viral por PCR quantitativa (qPCR). Para isso, 6 horas após a infecção amostras de sangue (500µl) foram coletadas através de punção da veia caudal utilizando um cateter tipo “Scalp borboleta” ou “butterfly” de 25G. A etapa de infecção, assim como todo o manejo e demais intervenções necessárias nos animais foi realizada em cabine de segurança biológica (CSB) (Tecniplast® BS 60 class II, Buguggiate, Italy). A cabine de segurança biológica que foi utilizada possui todas as especificações necessários para trabalhos com nível 2 de biossegurança (NB2) (filtro HEPA, luz UV, exaustão de 800 m³ /h, velocidade da cortina de ar $\geq 0,55$ m/s e velocidade do fluxo

descendente de 0,25+0,5 m/s, recirculação/exaustão de 60% e 40% respectivamente), atestada pela norma ISO 14644-1/2015 e pela regulamentação de critério de performance para CSB da União Europeia (EN 12469), disponível em (<https://eur-lex.europa.eu/procedure/EN/124469>). Assim, foram seguidas todas as recomendações de biossegurança para agentes biológicos classificados no nível 2, de acordo com a classificação de risco dos agentes biológicos (BRASIL, 2022), e com as recomendações para trabalhos com ZIKV do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION; NATIONAL CENTER FOR EMERGING AND ZOO NOTIC INFECTIOUS DISEASES, 2021). Após receberem as injeções, os animais foram monitorados para verificar efeitos adversos como dor e estresse, seguindo a recomendação da Resolução Normativa (RN) nº 33 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os procedimentos adotados foram realizados de acordo com os princípios éticos recomendados pelo CONCEA e pela Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008).

Após a realização do projeto piloto, foi definida a metodologia utilizada no Grupo 7 (administração i.p de 500ul, 1×10^6 , DIC₅₀ mL⁻¹) para a sequência dos experimentos desenvolvidos neste trabalho. Esta via de infecção foi escolhida por ser a mais efetiva e segura para os pesquisadores. Em relação a dose viral, foi utilizada a dose mais eficaz após a realização dos diagnósticos por qPCR. Além disso, a dosagem de vírus utilizada está de acordo com a utilizada por outros modelos descritos na literatura, como em camundongos (Dowall et al., 2016), ratos (Sherer et al., 2019) e primatas (Dudley et al., 2016; Osuna et al., 2016).

Ao todo, foram utilizadas 35 fêmeas nesta fase do estudo, divididas entre os grupos apresentados acima. A metodologia e o resultado dos estudos desenvolvidos após o projeto piloto são apresentados no capítulo II.

5 CAPÍTULO II. Zika Virus affects neurobehavioral development, and causes oxidative stress associated to blood-brain barrier disruption in a rat model of congenital infection.

(Publicado no periódico Brain, behavior, and immunity)

6 CAPÍTULO III. Pathophysiology of congenital Zika Virus infection

(Artigo de revisão da literatura)

7 DISCUSSÃO

No presente estudo propomos um modelo de infecção congênita em roedores com o objetivo de identificar distúrbios do neurodesenvolvimento e alterações no tecido nervoso em ratos *Wistar* após o nascimento. Também buscamos trazer uma descrição da fisiopatologia da infecção congênita pelo ZIKV, visando uma melhor compreensão dos danos já evidenciados causados por esta infecção.

No modelo aqui apresentado a infecção ocorreu no E9, período crítico para o neurodesenvolvimento dos roedores (SEMPLE et al., 2013). Interessantemente, no nosso estudo não foi observado comportamento doentio das fêmeas infectadas apesar dos danos neurológicos dos filhotes, corroborando achados anteriores onde também não foi observado o comportamento doentio nas fêmeas infectadas (SHERER et al., 2019). Este é um importante resultado, pois recentemente foi identificada a circulação do ZIKV em gestantes assintomáticas na região Nordeste do Brasil (BRANCO et al., 2021). Além disso, há evidências de que mesmo em gestantes assintomáticas infectadas, o neurodesenvolvimento da prole pode estar comprometido (SHAPIRO-MENDOZA et al., 2017). Em concordância, nosso estudo revelou atrasos importantes nas avaliações dos marcos do desenvolvimento nos filhotes, que podem ser consideradas preditivas de distúrbios cognitivos e/ou motores ao longo da vida. Além disso, no DPN 22, foram encontrados déficits de integridade da BHE no hipocampo e alteração do estado oxidativo no hipocampo e no córtex, o que indica que o ZIKV pode exercer persistentes alterações na estrutura e função cerebrais.

Em nossas avaliações não foram encontradas alterações na morfometria dos filhotes em relação ao tamanho corporal e/ou tamanho do crânio. No entanto, estudos prévios já apontavam que a ausência de alterações físicas evidentes ao nascimento, como a microcefalia, não poderia excluir a possibilidade de alterações no neurodesenvolvimento (ARAGAO et al., 2017; CARDOSO et al., 2019). Dessa forma, o presente estudo investigou o desenvolvimento dos filhotes utilizando avaliações dos marcos do desenvolvimento para identificar possíveis sequelas na prole decorrentes da infecção congênita pelo ZIKV.

As avaliações de características do neurodesenvolvimento em crianças permitem a identificação precoce do atraso no desenvolvimento típico, sendo essenciais para a atenção primária à saúde, principalmente na primeira infância. Assim, é possível iniciar rapidamente a intervenção e proporcionar meios para que os serviços de saúde e as famílias atuem, o mais cedo possível, prevenindo o agravamento do quadro e garantindo o breve início das ações

terapêuticas (LIU et al., 2010; SANDLER et al., 2001). Do ponto de vista translacional, as avaliações do neurodesenvolvimento (ou marcos do desenvolvimento) de roedores permitem inferir sobre o desenvolvimento sensório-motor e cognitivo dos animais (SMIRNOV; SITNIKOVA, 2019), sendo um importante indicativo de possíveis distúrbios do desenvolvimento na idade adulta (NGUYEN; ARMSTRONG; YAGER, 2017).

Em nosso estudo experimental, encontramos atrasos nos marcos do desenvolvimento no grupo ZKV nas seguintes avaliações; erupção dos dentes incisivos, posicionamento dos membros anteriores (unilateral), posicionamento dos membros posteriores (bilateral) e preensão dos membros anteriores (unilateral) foram identificados com atraso em ratos ZKV machos e posicionamento dos membros posteriores (bilateral) e reflexo de endireitamento em fêmeas, quando comparados com seus respectivos controles, mostrando que ambos os sexos são afetados. Este é um resultado notável, pois mesmo em lesões graves do sistema nervoso, como causadas por hipóxia-isquemia neonatal experimental, muitas vezes não são detectados prejuízos na avaliação do neurodesenvolvimento (DENIZ et al., 2018; SCHUCH et al., 2016). Ainda, identificamos atraso no reflexo de endireitamento em fêmeas, além de disfunção da marcha e do comportamento olfatório em machos, revelando mais uma vez atraso no desenvolvimento de ambos os sexos. Em consonância com nossos achados, um estudo que utilizou camundongos imunocompetentes também não encontrou alterações fenotípicas ao nascimento após a infecção pelo ZIKV, mas posteriormente foram observados prejuízos de aprendizado e memória (STANELLE-BERTRAM et al., 2018). Além disso, um estudo clínico recente realizado com mães que tiveram infecção pelo ZIKV durante a gravidez observou crianças sem qualquer alteração aparente ao nascimento, mas mostrando o surgimento de pelo menos um marcador de atraso no desenvolvimento entre 18 e 24 meses de vida (MAIA et al., 2021b). A revisão de literatura aqui apresentada também mostra achados referentes a ausência de sinais clínicos ao nascimento em bebês cujas mães sofreram infecção por ZIKV durante a gestação e chama atenção para a circulação do vírus em mulheres gestantes que não apresentam sintomas, o que é muito preocupante, uma vez que não está claro se em humanos esse fato pode ocasionar algum desfecho clínico desfavorável.

Buscando avançar nas avaliações a partir do modelo proposto, analisamos a integridade do tecido nervoso fazendo a quantificação neuronal, avaliando a integridade da BHE e o estado oxidativo do hipocampo e do córtex no DPN 22.

Estudos com inoculação de ZIKV realizados diretamente nos ratos neonatos após o nascimento identificaram morte neuronal e dano tecidual no córtex, hipocampo e medula

espinal (LI et al., 2018, 2021). A redução de espessura do córtex também foi observada quando a infecção foi realizada em camundongos prenhes, promovendo morte celular e consequente atrofia do tecido nervoso cortical da prole (CUGOLA et al., 2016). No entanto, em nosso estudo nenhuma diferença foi observada em relação a quantificação neuronal no córtex ou hipocampo. Este dado vai de encontro com a ausência de redução no tamanho da cabeça também observada no presente trabalho, uma vez que não houve perda tecidual expressiva. Na sequência, buscamos aprimorar a avaliação da integridade tecidual, avaliando a estrutura da BHE com foco em suas principais proteínas constituintes.

A BHE envolve o encéfalo e a medula espinal e é composta pelas células endoteliais, pericitos, pés terminais de astrócitos e membrana basal (GENG et al., 2018). A manutenção da integridade da BHE é fundamental para a homeostase do tecido nervoso, portanto, os distúrbios de permeabilidade resultantes de falhas nas junções de colusão/adesão são fatores-chave a serem considerados (OBERMEIER; DANEMAN; RANSOHOFF, 2013). Além disso, danos na BHE estão fortemente associados a deficiências cognitivas (BARISANO et al., 2022; GENG et al., 2018) e déficits no neurodesenvolvimento (DIAZ et al., 2016). Em nosso estudo, identificamos no hipocampo uma redução importante na quantidade das proteínas β -catenina, ocludina e conexina-43, componentes essenciais da BHE. Trabalhos anteriores com modelagem *in vitro* da BHE submetida à infecção por ZIKV mostraram que o vírus infectou células endoteliais e atravessou a barreira, no entanto, neste estudo, não houve evidência de alteração na permeabilidade da BHE (ALIMONTI et al., 2018). Em contrapartida, outro modelo de avaliação da BHE *in vitro* baseado em células humanas endoteliais semelhantes ao encéfalo (do inglês: *human brain-like endothelial cells* - hBLECs), foi identificado que após infecção por ZIKV houve redução da expressão das proteínas ocludina, claudina 5 e ZO-1 (do inglês: *Zonula occludens* - ZO), além disso foi detectada uma perturbação parcial da permeabilidade da BHE (Clé et al., 2020). Ainda, outro estudo mostrou que o ZIKV altera a expressão *in vitro* das proteínas constituintes da junção de oclusão, promovendo redução na expressão da claudina-5 e ocludina e causando aumento na expressão da ZO-1. No mesmo estudo, a infecção *in vivo* também causou redução na expressão da claudina-5 avaliada dois dias após infecção e afetou a integridade da BHE (LEDA et al., 2019). Curiosamente, um estudo com preparações de células nervosas mostrou que a infecção por ZIKV promove uma regulação positiva de mediadores inflamatórios, como interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (do inglês: *tumor necrosis factor* - TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β) (LUM et al., 2017); a expressão de fatores inflamatórios também foi identificada no modelo de BHE que utiliza hBLECs e pode

desencadear o recrutamento de células imunes e promover inflamação local adicional (CLÉ et al., 2020). A relação entre a disfunção da BHE e a neuroinflamação, como marca patológica na infecção pelo ZIKV, também vem sendo alvo de investigações (PANGANIBAN et al., 2020). Panganiban e colaboradores., 2020, observaram extravasamento de fibrinogênio (adotado como uma medida de distúrbio da BHE) associado a marcadores inflamatórios aumentados no sistema nervoso usando um modelo de infecção por ZIKV em primatas não humanos.

No presente estudo, as avaliações realizadas mostram que esta importante barreira de proteção do SNC foi estruturalmente afetada pela infecção congênita do ZIKV. Vale ressaltar que a infecção em nosso modelo foi realizada no E9 e alterações dos constituintes da BHE foram identificadas no DPN22, revelando que as alterações em decorrência da infecção gestacional parecem ser persistentes e podem contribuir para efeitos de longo prazo ainda não completamente esclarecidos.

Além da relação com a neuroinflamação, já foi demonstrado que alterações da BHE também podem estar relacionadas com o estresse oxidativo e ambas já foram identificadas após a infecção pelo ZIKV (ALMEIDA et al., 2020; CLÉ et al., 2020; OBERMEIER; DANEMAN; RANSOHOFF, 2013; PANGANIBAN et al., 2020). Nessa linha, buscamos identificar se o estresse oxidativo também poderia ser observado em nosso modelo.

Um desequilíbrio na produção de ERO ou a supressão das defesas antioxidantes intracelulares pode levar ao estresse oxidativo, causando danos intracelulares generalizados e até mesmo a morte celular (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Além disso, o aumento de ERO está intrinsecamente relacionado ao dano da BHE por meio de lesão oxidativa e modulação da expressão de proteínas constitutivas da BHE (OBERMEIER; DANEMAN; RANSOHOFF, 2013; PUN; LU; MOOCHHALA, 2009). Os nossos dados relativos à avaliação do estado oxidativo demonstraram redução da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no hipocampo e córtex, redução do conteúdo de sulfidrilas no hipocampo e redução dos níveis corticais de 2, 7 diclorofluoresceína diacetato (DCF), que indicaram claramente um desequilíbrio de ERO. Assim como identificado em nosso estudo, alterações oxidativas também foram observadas em um trabalho que avaliou astrócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas e camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV (LEDUR et al., 2020). Além disso, a diminuição da atividade das enzimas SOD e catalase (CAT) já foi relatada após a infecção pelo ZIKV em avaliações realizadas *in vitro* (usando as linhagens celulares U87-MG e HepG2) e *in vivo* (usando camundongos C57BL/6), com a infecção realizada diretamente nos filhotes (ALMEIDA et al., 2020).

Como descrito anteriormente, em nosso estudo não foi observada redução no número de neurônios, assim como não foi identificada diminuição tecidual significativa, o que pode explicar parcialmente a ausência de alteração nos níveis de peroxidação lipídica. Ainda, a redução no conteúdo de sulfidrilas pode ter relação com outras defesas antioxidantes, como a enzima glutatona, que não foram estudadas neste trabalho. Assim, é importante dizer que estudos futuros devem buscar uma melhor avaliação do estado oxidativo e das células gliais, principalmente os astrócitos que possuem um importante papel no metabolismo da glutatona, para esclarecer as nuances das alterações oxidativas aqui observadas.

No estudo com animais aqui descrito o desequilíbrio na função da BHE e no estado oxidativo foi identificado no tecido nervoso da prole vinte e dois dias após o nascimento, confirmando a hipótese de que a infecção gestacional pelo ZIKV em animais imunocompetentes resultaria em alterações duradouras. Assim, é razoável supor que o conjunto de alterações apresentado esteja relacionado com o atraso no desenvolvimento dos animais, chamando atenção para alterações persistentes em decorrência da infecção congênita.

Além dos dados experimentais, a revisão de literatura mostra que o ZIKV pode infectar diretamente diferentes células do SNC, causando alterações na função celular e impactando tanto a neurogênese quanto a sinaptogênese, promovendo importantes alterações na citoarquitetura do tecido nervoso, levando a morte celular e, portanto, causando importante impacto ao neurodesenvolvimento. Além das alterações previamente identificadas, um dado preocupante mostra que bebês nascidos de mães expostas ao ZIKV durante a gestação apresentam alterações de desenvolvimento, motoras e neurológicas, mesmo sendo assintomáticos ao nascimento, dado este que foi replicado utilizando nosso modelo experimental. É importante notar que não há uma completa compreensão em relação ao processo de infecção e de como as defesas inatas podem atuar de forma efetiva, uma vez que, há descrição na literatura de infecção gestacional por ZIKV durante a gravidez gemelar, com apenas um dos fetos sendo afetado e desenvolvendo graves alterações (VAN DER LINDEN et al., 2017).

O desenvolvimento de novos estudos com infecção gestacional por ZIKV deve buscar avançar na caracterização da infecção nos filhotes, através da utilização de marcadores específicos para identificar a possível presença do vírus e avaliar a complexa resposta inflamatória desencadeada após a infecção. A melhor distinção entre os efeitos deletérios causados diretamente pelo vírus e pela intrincada resposta de mediadores inflamatórios tanto maternos quanto fetais, pode auxiliar no estabelecimento de tratamentos mais efetivos que

visem o bloqueio dos efeitos deletérios descritos no estudo experimental e na revisão de literatura aqui apresentados.

Além de avançar na caracterização da infecção, o modelo experimental aqui proposto também pode ser útil na busca por biomarcadores que auxiliem na detecção precoce da infecção, aprimorando o diagnóstico nas mães e contribuindo para a detecção de alterações ocasionadas pela infecção/inflamação na prole. Neste campo, pode-se destacar a proteína C reativa, que é apontada como um importante biomarcador para infecções virais e bacterianas (HERWALD; EGESTEN, 2021; LEVINSON; WASSERMAN, 2022). Assim, este modelo poderia contribuir para a convergência na busca da identificação precoce da infecção, efetividade de tratamentos/terapias e avaliação de prognósticos, contribuindo para melhor compreensão da infecção congênita por ZIKV.

Em conclusão, este estudo revela a importância do acompanhamento das crianças com síndrome congênita diagnosticada, ou mesmo com apenas a suspeita de infecção gestacional por ZIKV e reforça a importância de estudos de longo prazo para identificar e mitigar eventos adversos que sequer foram completamente caracterizados. Desta forma, fica clara a importância da continuidade dos estudos para avançar na compreensão da síndrome congênita e das nuances do processo de infecção fetal, além da busca por esclarecer a miríade de eventos adversos que podem ser identificados em decorrência da infecção gestacional por ZIKV.

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos com este trabalho foi possível identificar que, mesmo sem alterações morfométricas dos filhotes e sem fenótipo semelhante à microcefalia, foram encontrados importantes déficits no desenvolvimento, sendo que os resultados aqui apresentados possuem uma importante correlação já demonstrada em estudos clínicos. Ainda, no modelo animal proposto estas alterações estão associadas a dano da BHE no hipocampo e córtex e desequilíbrio no estado oxidativo, vinte e dois dias após o nascimento, evidenciando um longo comprometimento decorrente da infecção gestacional. Atrasos no desenvolvimento psicomotor também são observados clinicamente, evidenciando o importante papel translacional do modelo animal aqui proposto. A partir deste estudo é possível destacar a importância em melhorar o diagnóstico pré-natal e a intervenção precoce nos casos de confirmação de infecção gestacional. Além disso, o modelo de infecção congênita aqui alvitrado também pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de tratamento novas e aprimoradas em estudos futuros.

Como perspectiva para a continuidade dos estudos com este modelo de infecção, seria interessante avaliar se podem ocorrer danos ao desenvolvimento de filhotes de ratas que não tiveram confirmação de infecção através dos testes de diagnóstico, além de buscar entender por que em alguns casos não é possível identificar a presença do vírus nas mães após a infecção. Ainda, é preciso avançar em estudos de longo prazo que visem ampliar a compreensão dos mecanismos envolvidos na síndrome congênita do ZIKV e os danos decorrentes desta infecção, utilizando, sempre que possível, uma abordagem translacional.

REFERÊNCIAS

- ADAMS WALDORF, K. M. et al. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. **Nature Medicine**, v. 22, n. 11, p. 1256–1259, 2016.
- ALIMONTI, J. B. et al. Zika virus crosses an in vitro human blood brain barrier model. **Fluids and barriers of the CNS**, v. 15, n. 1, 15 maio 2018.
- ALMEIDA, L. T. et al. Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities in vitro and in vivo. **Virus research**, v. 286, 1 set. 2020.
- ALVARADO, M. G.; SCHWARTZ, D. A. Zika Virus Infection in Pregnancy, Microcephaly, and Maternal and Fetal Health: What We Think, What We Know, and What We Think We Know. **Arch Pathol Lab Med**, v. 141, n. 1, p. 26–32, 2017.
- ARAGAO, M. F. V. V. et al. Nonmicrocephalic Infants with Congenital Zika Syndrome Suspected Only after Neuroimaging Evaluation Compared with Those with Microcephaly at Birth and Postnatally: How Large Is the Zika Virus “Iceberg”? **AJNR: American Journal of Neuroradiology**, v. 38, n. 7, p. 1427, 1 jul. 2017.
- ATKINSON, B. et al. Detection of Zika Virus in Semen. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 5, p. 940, 2016.
- BARISANO, G. et al. Blood–brain barrier link to human cognitive impairment and Alzheimer’s disease. **Nature Cardiovascular Research** 2022 1:2, v. 1, n. 2, p. 108–115, 7 fev. 2022.
- BECKER, R. Missing link: Animal models to study whether Zika causes birth defects. **Nat Med**, v. 22, n. 3, p. 225–227, 2016.
- BRANCO, R. C. C. et al. Evidence of Zika virus circulation in asymptomatic pregnant women in Northeast, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 6, 1 jun. 2021.
- BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **N Engl J Med**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 2016.
- BRASIL.SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. I. E I. E. EM SAÚDE. D. DE G. E I. DE T. E I. EM SAÚDE. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287, jun. 2011.
- CAMARGOS, V. N. et al. In-depth characterization of congenital Zika syndrome in immunocompetent mice: Antibody-dependent enhancement and an antiviral peptide therapy. **EBioMedicine**, v. 44, p. 516–529, 2019.

- CARDOSO, T. F. et al. Congenital Zika infection: neurology can occur without microcephaly. **Archives of Disease in Childhood**, v. 104, n. 2, p. 199–200, 1 fev. 2019.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION; NATIONAL CENTER FOR EMERGING AND ZOOONOTIC INFECTIOUS DISEASES. **Laboratory Safety when Working with Zika Virus**.
- CLÉ, M. et al. Zika Virus Infection Promotes Local Inflammation, Cell Adhesion Molecule Upregulation, and Leukocyte Recruitment at the Blood-Brain Barrier. **mBio**, v. 11, n. 4, p. 1–25, 2020.
- COYNE, C. B.; LAZEAR, H. M. Zika virus - reigniting the TORCH. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 11, p. 707–715, 2016.
- CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 1–15, 2016.
- CUI, L. et al. Visual and Motor Deficits in Grown-up Mice with Congenital Zika Virus Infection. **EBioMedicine**, v. 20, p. 193–201, 2017.
- DANEMAN, R.; PRAT, A. The Blood–Brain Barrier. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, 1 jan. 2015.
- DAVIDSON, A. et al. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 65, n. 28, p. 716–717, 2016.
- DE FATIMA VASCO ARAGAO, M. et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **BMJ**, v. 353, p. i1901, 2016.
- DENIZ, B. F. et al. Gestational folic acid supplementation does not affects the maternal behavior and the early development of rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia but the high supplementation impairs the dam's memory and the Na⁺, K⁺ - ATPase activity in the pup's . **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 71, n. 1, p. 181–192, 11 dez. 2018.
- DIAZ, R. et al. Environmental enrichment attenuates the blood brain barrier dysfunction induced by the neonatal hypoxia-ischemia. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 35–45, 17 out. 2016.
- DICK, G. W. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 46, n. 5, p. 521–534, 1952.
- DOLK, H. The predictive value of microcephaly during the first year of life for mental retardation at seven years. **Dev Med Child Neurol**, v. 33, n. 11, p. 974–983, 1991.

- D'ORTENZIO, E. et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **N Engl J Med**, v. 374, n. 22, p. 2195–2198, 2016.
- FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.
- FRANÇA, G. V et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 891–897, 2016.
- GABURRO, J. et al. Zika virus-induced hyper excitation precedes death of mouse primary neuron. **Virol J**, v. 15, n. 1, p. 79, 2018.
- GENG, J. et al. Blood-brain barrier disruption induced cognitive impairment is associated with increase of inflammatory cytokine. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, n. MAY, p. 129, 7 maio 2018.
- HERWALD, H.; EGESTEN, A. C-Reactive Protein: More than a Biomarker. **Journal of Innate Immunity**, v. 13, n. 5, p. 257–258, 1 set. 2021.
- IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Med Mal Infect**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.
- JOHANSSON, M. A. et al. Zika and the Risk of Microcephaly. **N Engl J Med**, v. 375, n. 1, p. 1–4, 2016.
- KLEBER DE OLIVEIRA, W. et al. Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 9, p. 242–247, 11 mar. 2016.
- KUBLIN, J. L.; WHITNEY, J. B. Zika Virus Research Models. **Virus research**, v. 254, p. 15, 2 ago. 2018.
- LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 5, p. 720–730, 11 maio 2016.
- LEDA, A. R. et al. Selective Disruption of the Blood–Brain Barrier by Zika Virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 18 set. 2019.
- LEDUR, P. F. et al. Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1218, 27 jan. 2020.
- LEVINSON, T.; WASSERMAN, A. C-Reactive Protein Velocity (CRPv) as a New Biomarker for the Early Detection of Acute Infection/Inflammation. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 15, 1 ago. 2022.

- LI, S. et al. Zika Virus Fatally Infects Wild Type Neonatal Mice and Replicates in Central Nervous System. **Viruses**, v. 10, n. 1, p. 49, 22 jan. 2018.
- LI, Y. et al. Zika virus induces neuronal and vascular degeneration in developing mouse retina. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 9, n. 1, p. 97, 25 dez. 2021.
- LIU, J. et al. Neonatal Neurobehavior Predicts Medical and Behavioral Outcome. **Pediatrics**, v. 125, n. 1, p. e90, jan. 2010.
- LUM, F. M. et al. Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces Inflammation. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 64, n. 7, p. 914–920, 1 abr. 2017.
- MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.
- MAIA, A. M. P. C. et al. Neurological growth and development of children asymptomatic at birth whose mothers had Zika during pregnancy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. 1–8, 2021a.
- MAIA, A. M. P. C. et al. Neurological growth and development of children asymptomatic at birth whose mothers had Zika during pregnancy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. 1–8, 2021b.
- MANSUY, J. M. et al. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 4, p. 405, 2016.
- MINER, J. J. et al. Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. **Cell reports**, v. 16, n. 12, p. 3208–3218, 20 set. 2016.
- MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Understanding how zika virus enters and infects neural target cells. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 559–560, 2016.
- MORRIS, J. K. et al. Prevalence of microcephaly in Europe: population based study. **BMJ**, v. 354, p. i4721, 2016.
- NGUYEN, A. T.; ARMSTRONG, E. A.; YAGER, J. Y. Neurodevelopmental Reflex Testing in Neonatal Rat Pups. **Journal of visualized experiments : JoVE**, v. 2017, n. 122, 24 abr. 2017.
- OBERMEIER, B.; DANEMAN, R.; RANSOHOFF, R. M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. **Nature medicine**, v. 19, n. 12, p. 1584–1596, dez. 2013.
- ONORATI, M. et al. Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. **Cell reports**, v. 16, n. 10, p. 2576, 1 set. 2016.

- PANGANIBAN, A. T. et al. A Zika virus primary isolate induces neuroinflammation, compromises the blood-brain barrier and upregulates CXCL12 in adult macaques. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 30, n. 6, p. 1017–1027, 1 nov. 2020.
- PATEL, R. T. et al. An examination of the long-term neurodevelopmental impact of prenatal zika virus infection in a rat model using a high resolution, longitudinal mri approach. **Viruses**, v. 13, n. 6, 1 jun. 2021.
- PAUL, A. M. et al. Congenital Zika Virus Infection in Immunocompetent Mice Causes Postnatal Growth Impediment and Neurobehavioral Deficits. **Front Microbiol**, v. 9, n. AUG, p. 2028, 2018.
- PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. **Nature**, v. 560, n. 7720, p. 573–581, 30 ago. 2018.
- PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology** 2020 **5:6**, v. 5, n. 6, p. 796–812, 4 maio 2020.
- PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 1 jul. 2016.
- PUN, P. B. L.; LU, J.; MOOCHHALA, S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. **Free radical research**, v. 43, n. 4, p. 348–364, 2009.
- REYNOLDS, M. R. et al. Vital Signs: Update on Zika Virus-Associated Birth Defects and Evaluation of All U.S. Infants with Congenital Zika Virus Exposure - U.S. Zika Pregnancy Registry, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 66, n. 13, p. 366–373, 2017.
- ROSA-FERNANDES, L. et al. Zika Virus Impairs Neurogenesis and Synaptogenesis Pathways in Human Neural Stem Cells and Neurons. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 13, 29 jan. 2019.
- SANDLER, A. D. et al. Developmental Surveillance and Screening of Infants and Young Children. **Pediatrics**, v. 108, n. 1, p. 192–195, 1 jul. 2001.
- SCHUCH, C. P. et al. Early environmental enrichment affects neurobehavioral development and prevents brain damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Neuroscience Letters**, v. 617, p. 101–107, 2016.
- SEMPLE, B. D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in neurobiology**, v. 0, p. 1, jul. 2013.

- SHAPIRO-MENDOZA, C. K. et al. Pregnancy Outcomes After Maternal Zika Virus Infection During Pregnancy - U.S. Territories, January 1, 2016–April 25, 2017. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 66, n. 23, p. 615–621, 16 jun. 2017.
- SHERER, M. L. et al. Zika virus infection of pregnant rats and associated neurological consequences in the offspring. **PLOS ONE**, v. 14, n. 6, p. e0218539, 1 jun. 2019.
- SHERER, M. L. et al. A Rat Model of Prenatal Zika Virus Infection and Associated Long-Term Outcomes. **Viruses**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2021.
- SMIRNOV, K.; SITNIKOVA, E. Developmental milestones and behavior of infant rats: The role of sensory input from whiskers. **Behavioural Brain Research**, v. 374, p. 112143, 18 nov. 2019.
- SOBRAL DA SILVA, P. F. et al. Neurodevelopment in Children Exposed to Zika Virus: What Are the Consequences for Children Who Do Not Present with Microcephaly at Birth? **Viruses**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2021.
- STANELLE-BERTRAM, S. et al. Male offspring born to mildly ZIKV-infected mice are at risk of developing neurocognitive disorders in adulthood. **Nature microbiology**, v. 3, n. 10, p. 1161–1174, 1 out. 2018.
- STATES, U. et al. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. **J Virol**, v. 90, n. 10, p. 4864–4875, 2016.
- SZABA, F. M. et al. Zika virus infection in immunocompetent pregnant mice causes fetal damage and placental pathology in the absence of fetal infection. **PLoS Pathog**, v. 14, n. 4, p. e1006994, 2018.
- TANG, H. et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell stem cell**, v. 18, n. 5, p. 587–590, 5 maio 2016a.
- TANG, W. W. et al. Report A Mouse Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral Replication Report A Mouse Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral Replication. **CellReports**, v. 17, n. 12, p. 3091–3098, 2016b.
- VAN DER LINDEN, V. et al. Discordant clinical outcomes of congenital zika virus infection in twin pregnancies. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 75, n. 6, p. 381–386, 1 jun. 2017.
- VENTURI, G. et al. An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014. **Euro Surveill**, v. 21, n. 8, p. 30148, 2016.
- VON DER HAGEN, M. et al. Diagnostic approach to microcephaly in childhood: a two-center study and review of the literature. **Dev Med Child Neurol**, v. 56, n. 8, p. 732–741, 2014.

VUE, D.; TANG, Q. Zika Virus Overview: Transmission, Origin, Pathogenesis, Animal Model and Diagnosis. **Zoonoses (Burlington, Mass.)**, v. 1, n. 1, 7 dez. 2021.

WU, K.-Y. Y. et al. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. **Cell Res**, v. 26, n. 6, p. 645–654, 2016.

XAVIER-NETO, J. et al. Hydrocephalus and arthrogryposis in an immunocompetent mouse model of ZIKA teratogeny: A developmental study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 2, p. e0005363, 2017.

ZHANG, N. et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell stem cell**, v. 19, n. 1, p. 120–126, 1 jul. 2016.

APÊNDICE I

Resultados adicionais referentes ao modelo experimental apresentado na tese.

Adicionalmente aos dados apresentados na tese, foram realizadas avaliações para identificar o número de implantações uterinas e reabsorções nas fêmeas prenhas dos grupos experimentais. Ainda, o ganho de peso durante o período gestacional foi avaliado assim como o estado geral das fêmeas após a infecção. Abaixo são apresentados os resultados destas avaliações.

Não foram observadas alterações significativas em relação ao número de implantações uterinas CT (9.0 ± 1.1) ZKV (11.6 ± 0.7) (figura 1). O número de reabsorções também foi analisado em ambos os grupos sendo que no grupo CT foram observadas três reabsorções dentre todas as fêmeas e no grupo ZKV apenas uma, não indicando nenhuma alteração nestes parâmetros.

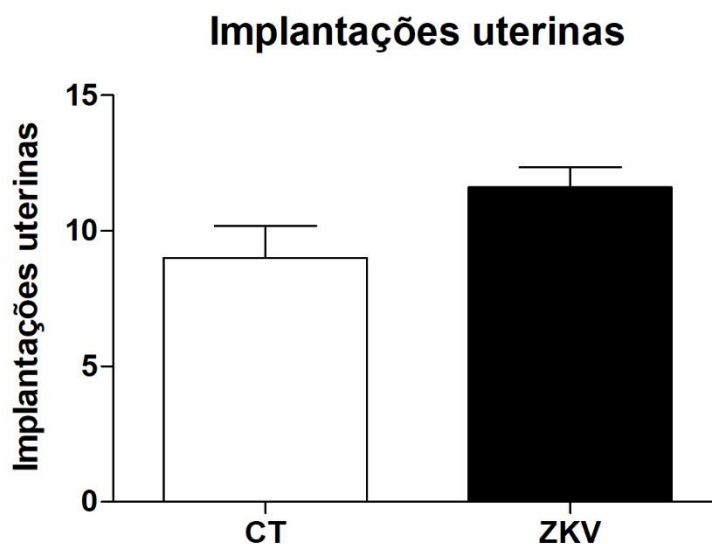


Figura 1. Número de implantações uterinas identificadas nas fêmeas. CT, fêmeas prenhas do grupo controle (n=6). ZKV, fêmeas prenhas do grupo infectado com o vírus Zika durante o período gestacional (n=5). Dados apresentam média \pm desvio padrão. Teste T de Student ($p < 0,05$).

Em relação ao peso gestacional, a curva de ganho de peso foi similar para ambos os grupos. Na análise de variância para medidas repetidas não houve alteração significativa na média de ganho de peso ao longo dos dias analisados ($F(1,27) = 3,38, p=0,09$), no entanto, o teste t adicional mostrou uma pequena diferença apenas no G20 ($t(9) = 2,34, p<0,05$), sendo que as fêmeas do grupo ZKV apresentaram um peso ligeiramente maior do que as fêmeas CT. A média de peso das fêmeas do grupo ZKV foi ligeiramente maior desde a primeira avaliação, como pode ser observado no gráfico que representa o ganho de peso (figura 2). Como dito anteriormente, a curva de ganho de peso foi semelhante para ambos os grupos, assim essa pequena variação ao final do período gestacional não parece ter nenhuma implicação relacionada diretamente ao procedimento experimental realizado.

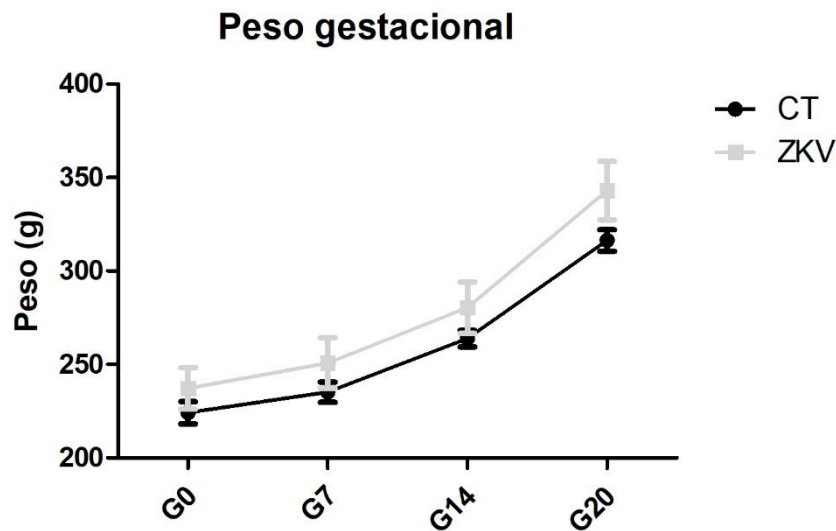


Figura 2. Gráfico referente ao ganho de peso das fêmeas durante o período gestacional. CT, fêmeas prenhas do grupo controle (n=6). ZKV, fêmeas prenhas do grupo infectado com o vírus Zika durante o período gestacional (n=5). Dados apresentam média \pm desvio padrão. ANOVA de uma via para medidas repetidas e teste T de Student ($p<0,05$).

Após a infecção gestacional das fêmeas, elas foram monitoradas diariamente para a verificação do estado geral e identificação de possíveis sinais de infecção ou sofrimento que

pudessem justificar alguma intervenção. Foram preparadas fichas individuais para acompanhamento dos animais após a infecção, no entanto, nenhuma mudança de comportamento que indicasse um processo patológico ou sofrimento (como prostração, pelo eriçado, postura curvada ou redução de interação) foi observado nos animais. Assim como observado no presente trabalho, em um estudo prévio com infecção gestacional em ratas, as fêmeas infectadas também não apresentaram comportamentos que indicassem um processo infeccioso ou sofrimento (Sherer et al., 2019). Adicionalmente, dados da literatura mostram que a infecção assintomática por ZIKV nas mulheres gestantes pode ser frequente (Ioos et al., 2014).

Assim, em conclusão, podemos observar que no modelo animal aqui apresentado, mesmo sem sinais visíveis de infecção nas fêmeas e sem alterações fenotípicas nos filhotes foram identificados importantes atrasos no neurodesenvolvimento e alterações no encéfalo da prole. Estes dados reforçam a importância da continuidade dos estudos que visem aprofundar o conhecimento da fisiopatologia da infecção congênita por ZIKV.