

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA SÍNDROME
CONGÊNITA POR VÍRUS ZIKA UTILIZANDO EMBRIÕES DE GALINHA**

Gabriela Elis Wachholz

Orientadora: Profa. Dra. Lavínia Schuler Faccini

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Rosa Fraga

Porto Alegre,

Junho de 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTABELECIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA SÍNDROME
CONGÊNITA POR VÍRUS ZIKA UTILIZANDO EMBRIÕES DE GALINHA**

Gabriela Elis Wachholz

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Genética e Biologia Molecular.**

Orientadora: Profa. Dra. Lavínia Schuler Faccini

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Rosa Fraga

Porto Alegre,

Junho de 2021

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

O presente trabalho teve como fontes financiadoras o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Reprodutiva e do Desenvolvimento e no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Genética Médica e Populacional do Instituto de Biociências também da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq, vinculada ao PPGBM/UFRGS, e durante cinco meses recebeu bolsa de intercâmbio pelo programa UAM-Santander, possibilitada pelo vínculo entre a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Universidad Autónoma de Madrid.

Àquele que me ensinou a apreciar a grandiosidade da natureza desde muito pequena, acompanhou os resultados dos meus experimentos com muita paciência e disse que eu ia muito longe (literalmente).

Obrigada por tanto, vô Dino.

AGRADECIMENTOS

Às pessoas mais importantes da minha vida: minha mãe e meu pai, Fabiana e Sandro Wachholz. Minha base e meu apoio em tudo, sempre me ajudando a seguir em frente e sempre me lembrando o quão longe eu posso chegar. Obrigada por serem tanto para mim e por tanto carinho, sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui. Amo muito vocês. Aos meus avós, que me acompanham em todos os momentos, mandando todas as energias boas para que dê tudo certo sempre, vó Cy e vô Bio, e ao vô Dino (*in memorian*) e à vó Nena (*in memorian*) que seguem me cuidando e me protegendo por onde eu for. Também ao Chokito (*in memorian*), à Chica e ao Ramon.

Aos meus grandes pais científicos que me ensinaram sobre ciência, mas muito sobre seriedade e integridade. À Lav, minha orientadora desde os primórdios da graduação, que me ensinou que a simpatia é o segredo do sucesso, além de tudo que sei sobre genética. Ao Lucas, meu orientador, que me ensinou sobre embriologia e que “o que é certo é certo, e que o que é errado é errado” (espero que eu tenha te mostrado que sou melhor que aquela guriuzinha apavorada no CGM em 2017). Obrigada por tanto conhecimento, por tanto apoio, carinho, por todas as oportunidades e por impulsionarem tanto meu crescimento.

Ao pessoal do LabChicken, especialmente Sophi, meu braço direito, Ana Paula e Thais, que me ensinaram tudo que sei sobre virologia e tornaram os dias de experimento muito felizes, João e Bruna, meus companheiros desde os primeiros experimentos com as galinhas, e ao Arthur, André, Karina e Maikel. Aos professores e alunos do LabVir pelo acolhimento. Ao pessoal do Lab113, do LMG e do SIAT, especialmente Juliano, Julia, Thay e Mari. *I would like also to thank Gabriela and Zuzana y decir muchas gracias a Ignacio.*

Aos meus melhores amigos Duda, Bruno, Issler e Mandi, que me acompanham desde a escola e estão sempre comigo, torcendo e me dando todo amor do mundo. À minha amiga de Bio, de autoclave e de vida, Julia. Ao Fabiano da Relinter por ter me unido a minha família espanhola: Deia, Bru, Mel, Kelen e Thi, los amo. Ao programa UAM-Santander pela experiência na Espanha e a todos os amigos que fiz aqui: *gracias, merci e grazie mille!*

Ao pessoal do PPGBM, em especial ao Elmo que desde antes de eu fazer a prova para a bolsa do Mestrado já me aguentava tirando todas minhas dúvidas e sempre me ajudou em todos os momentos que eu precisei. Ao professor Thales também por toda ajuda.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
CAPÍTULO 1. Introdução.....	8
1.1. Teratogênese.....	9
1.2. Teratogênese Experimental.....	13
1.3. Embrião de galinha e seu uso na teratogênese experimental.....	16
1.4. Vírus Zika (ZIKV) e a Síndrome Congênita pelo Vírus Zika.....	18
1.5. Modelos experimentais em ZIKV: achados morfológicos e de mecanismos.....	20
CAPÍTULO 2. Justificativa e Objetivo.....	25
2.1. Justificativa.....	26
2.2. Objetivo.....	27
CAPÍTULO 3. Artigo Publicado: <i>Zika virus-induced brain malformations in chicken embryos</i>.....	28
CAPÍTULO 4. Considerações Finais.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXOS.....	58
Anexo A- Artigo Publicado: Molecular mechanisms of Zika virus teratogenesis from animal studies: a systematic review protocol.....	59
Anexo B- Artigo Aceito para Publicação: From the farm to the lab: how chicken embryos contribute to the field of teratology.....	67
Anexo C- Artigo Aceito para Publicação: Possible emergence of Zika virus African lineage in Brazil and the risk for new outbreaks.....	91

RESUMO

Após a epidemia de casos de infecção por Zika vírus (ZIKV) e o subsequente aumento abrupto no número de crianças nascendo com microcefalia, a associação entre a exposição à infecção durante a gestação e o desenvolvimento dessas anomalias congênitas foi estabelecida. Assim, em 2016, o ZIKV foi definido como novo teratógeno humano, sendo o causador da Síndrome Congênita por ZIKV (SCZ). Apesar de muitos estudos terem sido realizados visando elucidar os mecanismos de ação do ZIKV, ainda há muitas perguntas sem resposta. Portanto, existe a necessidade do estabelecimento de modelos experimentais que sirvam como ferramenta para a maior compreensão dos mecanismos teratogênicos do vírus. Neste contexto, os embriões de galinha são uma excelente alternativa como modelo experimental principalmente por apresentarem fácil manipulação e baixo custo. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um modelo experimental para a SCZ utilizando embriões de galinha. Para tanto, primeiramente foi realizada uma avaliação do efeito de diferentes doses virais de ZIKV para a seleção daquela ideal, ou seja, capaz de gerar malformações, porém sem causar altas taxas de mortalidade. A avaliação completa dos fenótipos relacionados ao desenvolvimento encefálico também foi realizada. Em seguida foram conduzidos experimentos de acompanhamento fenotípico dos embriões durante cinco dias após a infecção. A infecção viral foi realizada através de aplicação do vírus sobre o embrião nos estágios iniciais de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Embriões que foram expostos a infecção por ZIKV apresentaram maior taxa mortalidade, tamanho encefálico reduzido e maior taxa de malformações de SNC, seguindo um padrão dose-dependente. As malformações se tornaram mais evidentes no quarto dia após a infecção, mesmo tempo em que se observou um pico na carga viral. O estabelecimento desse novo modelo experimental utilizando embriões de galinha possibilita a realização de novos estudos visando compreender os mecanismos moleculares envolvidos na ação teratogênica do ZIKV. Além disso, esse modelo experimental terá uma contribuição importante para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e resgate dos fenótipos causados pela exposição ao vírus, sendo possível testar o potencial preventivo de substâncias farmacológicas conhecidas ou em desenvolvimento.

Palavras-chave: anomalias congênitas, síndrome congênita por ZIKV, embriões, malformações do sistema nervoso central, microcefalia

ABSTRACT

After the epidemic of Zika virus (ZIKV) and the following abrupt increase in the number of children born with microcephaly, the association between the exposure to the infection during pregnancy and the development of these malformations was established. Consequently, in 2016, ZIKV was identified as new human teratogen, being the causative agent of the Congenital ZIKV Syndrome (CZS). Despite there are many studies trying to better understand the mechanism related to CZS, there are still unanswered questions. Therefore, there is a need of establishing experimental models to be used as tools to a better understanding of the ZIKV teratogenic mechanisms. In this context, chicken embryos are an excellent alternative as experimental model, since they are easy to manipulate and cheap. Hence, the aim of this work was to establish an experimental model for CZS using chicken embryos. For that, firstly an evaluation of different ZIKV viral doses was performed to select the best dose, capable to induce to malformations without generating high rates of embryo mortality. A complete evaluation of the phenotypes after the exposure to ZIKV was also conducted. Then, phenotype follow-up was performed during five days post-infection. The viral infection was performed by applying the virus over the embryo in the initial stages of central nervous system (CNS) development. Embryos exposed to ZIKV infection presented high mortality rate, reduced brain size and a higher rate of CNS malformations, following a dose-dependent pattern. The malformations became more evident by day the fourth post-infection, at the same day when the ZIKV reached the peak of replication. By the establishment of this new experimental model for CZS using chicken embryos, other studies aiming to understand the molecular mechanisms involved in the ZIKV teratogenic action can be performed. Furthermore, this experimental model will contribute to the development of prevention and rescue approaches to the malformations caused by the exposure to ZIKV. Therefore, it will be possible to test the preventive potential of pharmacological substances already known or in development.

Keywords: congenital anomalies, congenital zikv syndrome, embryos, central nervous system malformations, microcephaly

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1. Teratogênese

As anomalias congênitas (AC) podem ser classificadas como alterações estruturais ou funcionais presentes ao nascimento, podendo ser diagnosticadas durante o período pré-natal, logo após o nascimento ou ainda mais tarde (Christianson *et al.*, 2006; WHO, 2020a). Em termos populacionais, existe um risco de 3% para ocorrência de AC (Kalter and Warkany, 1983). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, na América Latina as AC são responsáveis por cerca de 19 a 39% das mortes de crianças durante a primeira infância (WHO, 2020b).

A etiologia das AC muitas vezes é desconhecida, e grande parte é definida como sendo de causa multifatorial, representando cerca de 50 a 75% dos casos (Brent, 2001; WHO, 2020a). Os casos em que se conhecem a causa da AC normalmente estão relacionados a anomalias cromossômicas, doenças monogênicas e a fatores ambientais. Condições maternas e exposição a agentes teratogênicos representam grande parte dos fatores ambientais, responsáveis por cerca de 10% dos casos das AC (Brent, 2001).

A ciência responsável por estudar e entender os mecanismos envolvidos nos efeitos dos agentes teratogênicos em sistemas em desenvolvimento, como células germinativas, embriões e fetos é a teratologia (do grego *teratos*, significando “monstro”, e *logos*, significando “o estudo de”) (Ujhazy *et al.*, 2012). Os agentes teratogênicos são aqueles capazes de interferir no desenvolvimento embrionário, podendo levar a AC (Dicke, 1989). Diferentes agentes podem ser classificados como teratogênicos, sendo eles condições maternas, drogas ilícitas e lícitas, medicamentos e infecções congênitas e outros agentes biológicos, assim como agentes físicos (Brent, 2001; Fraga *et al.*, 2016; Vargesson and Fraga, 2017; Moore *et al.*, 2019; Tabela 1).

Tabela 1. Principais Agentes Teratogênicos.

Classes Agentes Teratogênicos	Exemplos	Fenótipos Relacionados	Referências
<i>Condições Maternas</i>	Obesidade	Macrossomia, restrição de crescimento fetal, morte fetal tardia e defeitos de fechamento de tudo neural	Andreasen <i>et al.</i> , 2004 Norman <i>et al.</i> , 2011
	Hipertermia	Defeitos de fechamento de tubo neural, malformações cardíacas e fendas orais	Dreier <i>et al.</i> , 2014
	Epilepsia	Abortamento, hemorragia pré e pós-parto, hipertensão, nascimento prematuro e restrição de crescimento fetal	Viale <i>et al.</i> , 2015
<i>Drogas Ilícitas</i>	Cocaína	Nascimento prematuro, restrição de crescimento fetal e impactos no desenvolvimento cognitivo	Gouin <i>et al.</i> , 2011 Cain <i>et al.</i> , 2013
<i>Drogas Lícitas</i>	Tabaco	Aumento do risco de abortamento, redução do crescimento fetal e anomalias placentárias	Marufu <i>et al.</i> , 2015 Gould <i>et al.</i> , 2020
	Álcool	TEAF e SAF, caracterizada por déficit cognitivo, redução de peso e crescimento, redução da circunferência encefálica e fenótipos faciais característicos	Nayak and Murthy, 2008 Dejong <i>et al.</i> , 2019 Oei <i>et al.</i> , 2020
<i>Medicamentos</i>	Isotretinoína	Hidrocefalia, microcefalia, microtia ou ausência de orelhas, fendas orais, malformações cardíacas	Benke <i>et al.</i> , 1984 Altıntaş <i>et al.</i> , 2020
	Ácido valpróico	Meningomielocele, malformações cardíacas, fendas orais, hipospadia, polidactilia, craniossinostose e impactos no desenvolvimento cognitivo	Diav-Citrin <i>et al.</i> , 2008 Ornoy <i>et al.</i> , 2009 Jentink <i>et al.</i> , 2010

Continuação

	Misoprostol	Malformações de SNC, musculoesqueléticas, urogenitais, cardiovascular e de membros e Síndrome de <i>Mobius</i> , caracterizada pela paralisia fácil congênita	Pastuszak <i>et al.</i> , 1998 Vargas <i>et al.</i> , 2000 Opaleye <i>et al.</i> , 2010
<i>Agentes Biológicos</i>	Toxoplasmose	Hidrocefalia, microcefalia, abortamentos, natimortos, perda auditiva, coriorretinite e impactos no desenvolvimento cognitivo	Jones <i>et al.</i> , 2001 Kieffer and Wallon, 2013 Fallahi <i>et al.</i> , 2018
	Rubéola	Síndrome Congênita por Rubéola, caracterizada por cegueira, catarata, microftalmia, hepatoesplenomegalia, malformações cardíacas, impactos no desenvolvimento cognitivo e no neurodesenvolvimento	Yazigi <i>et al.</i> , 2017 Kaushik <i>et al.</i> , 2018 George <i>et al.</i> , 2019
	Citomegalovírus	Perda auditiva e impactos no neurodesenvolvimento	Chiopris <i>et al.</i> , 2020 Martinez-Gomez <i>et al.</i> , 2020
	Herpes vírus	Lesões cutâneas, queratite e impactos no neurodesenvolvimento	Fa <i>et al.</i> , 2020
<i>Agentes Físicos</i>	Radiação Ionizante	Microcefalia, comprometimento cognitivo e redução de crescimento se a exposição ocorrer antes da implantação embrionária	Gilbert-Barness, 2010 Vargesson and Fraga, 2017

Abreviaturas: TEAF: Transtornos do Espectro Alcoólico Fetal; SAF: Síndrome Alcoólica Fetal; SNC: Sistema Nervoso Central.

Os primeiros relatos da teratologia surgiram a partir da publicação de Hale, em 1935. Neste estudo, o autor utilizou porcas grávidas que foram alimentadas com uma dieta deficiente em vitamina A. Os resultados evidenciaram a influência da dieta materna no desenvolvimento das crias, uma vez que os filhotes das porcas nasceram com um conjunto de malformações, sendo a mais evidente delas a cegueira congênita causada pela ausência dos olhos (Hale, 1935). Esses achados foram também confirmados por Josef Warkany em 1946 usando ratas grávidas, demonstrando que condições maternas podem afetar o desenvolvimento (Warkany and Schrafenberger, 1946). Alguns anos após a publicação dos experimentos de Hale, relatos de casos de crianças com catarata congênita nascidas de mães que tiveram rubéola durante a gestação também foram fundamentais para a demonstração de que fatores ambientais poderiam interferir no desenvolvimento dos embriões e fetos. Até aquele momento se pensava que a placenta funcionava como uma barreira capaz de evitar qualquer dano de origem externa ao concepto (Gregg, 1941).

Um outro marco na história da teratogênese foi a descoberta do efeito teratogênico da talidomida no início da década de 1960. A exposição à talidomida durante o período pré-natal é capaz de induzir a uma série de malformações, caracterizando a Embriopatia da Talidomida. Essas malformações características abrangem principalmente os membros, coração, olhos, ouvidos e órgãos internos (Smithelis and Newman, 1992; Vargesson, 2009; Vianna *et al.*, 2013; Vargesson, 2015; Kowalski *et al.*, 2015; Fraga *et al.*, 2016; Vargesson, 2019). A conhecida tragédia da talidomida teve implicações muito importantes em relação ao desenvolvimento de novas medicações, ensinando na prática a importância da avaliação prévia dos possíveis efeitos teratogênicos de um determinado medicamento através de testes de toxicologia reprodutiva e toxicologia do desenvolvimento em mais de um modelo animal antes do início dos estudos clínicos. Além disso, a partir da tragédia da talidomida, criaram-se sistemas de vigilância e de informação no mundo todo (Vargesson, 2013; Vargesson, 2015).

A partir dessas primeiras observações relacionadas com efeitos teratogênicos, algumas premissas foram propostas por James Wilson em 1949 e publicadas definitivamente como os seis princípios da teratologia em 1973 (Wilson, 1973). As principais premissas postuladas por Wilson que descrevem os fatores responsáveis por influenciar no efeito teratogênico da exposição a um determinado agente estão relacionadas (a) ao estágio de desenvolvimento do concepto no momento da exposição ao agente teratogênico, (b) à

relação entre a dose de exposição e o efeito observado, (c) ao mecanismo específico apresentado por cada agente, (d) à natureza do agente e a importância da heterogeneidade genética, ou seja do genótipo materno-fetal para a definição do efeito da exposição. Portanto, o efeito da exposição durante a gestação a um determinado agente teratogênico depende de diferentes fatores. Dessa forma, observa-se uma variedade de desfechos nos conceitos como morte intrauterina, defeitos de desenvolvimento, redução do crescimento fetal, distúrbios funcionais, incluindo a possível ausência de efeitos teratogênicos (Moore *et al.*, 2019).

Nos anos 1990 foram definidos sete critérios para a identificação de novos agentes teratogênicos (Shepard, 1994). Dentre esses critérios estão: a exposição ao agente em momentos críticos do desenvolvimento, a apresentação de evidências epidemiológicas, descrição detalhadas de casos clínicos, uma exposição ambiental rara relacionada a uma malformação igualmente rara e a presença de um sentido biológico por trás dessas associações. Outro critério sugerido pelo autor é a comprovação da teratogenicidade do agente utilizando estudos *in vivo*, que embora não essencial, é fundamental para auxiliar no entendimento dos processos e mecanismos de teratogênese de agente teratogênicos conhecidos e para avaliar potenciais riscos de substâncias cujo potencial teratogênico ainda é desconhecido. A partir da demonstração do potencial teratogênico de determinado agente e da confirmação dos achados em humanos em um ambiente controlado é possível compreender seus mecanismos de ação.

1.2. Teratogênese Experimental

A avaliação e/ou comprovação do potencial teratogênico de determinado agente é apenas uma das atribuições da teratogênese experimental. Através de estudos *in vivo* e também *in vitro*, é possível compreender o potencial teratogênico de novas substâncias e de agentes infecciosos, além de serem fundamentais para a determinação dos mecanismos de teratogênese implicados. A determinação dos mecanismos relacionados as AC causadas pela exposição a determinado agente teratogênico é essencial para a compreensão de todo o processo de teratogênese, bem como para desenvolver estratégias preventivas. Portanto, a teratogênese experimental possui várias implicações, podendo ser elas voltadas para a compreensão e confirmação de risco previamente observado, para a avaliação de potenciais riscos ainda desconhecidos, incluindo a avaliação do potencial teratogênico de fármacos e

para definição dos mecanismos envolvidos nos efeitos teratogênicos de um determinado agente (Vargesson and Fraga, 2017).

Por razões éticas, a avaliação de teratogênese em humanos é realizada apenas de maneira observacional. Neste contexto, os modelos animais são essenciais para a condução de intervenções experimentais e avaliações de desfechos. Esses modelos são fonte principal de conhecimento sobre o potencial teratogênico de muitos agentes, que posteriormente pode ser extrapolado para os humanos (Vargesson and Fraga, 2017).

No desenvolvimento de fármacos, os estudos em toxicologia reprodutiva e do desenvolvimento necessitam utilizar duas espécies de modelos experimentais, sendo uma delas alternativa aos roedores, já que a sensibilidade a determinados agentes teratogênicos varia muito entre diferentes espécies, como observado nos experimentos com talidomida (Wilson, 1973; Janer *et al.*, 2008; Vargesson, 2013; Vargesson, 2015). Os animais mais utilizados como modelos experimentais para a avaliação do potencial teratogênico de fármacos e também para compreender os mecanismos que levam às malformações são embriões de *zebrafish*, galinha, roedores, porcos, porcos da Índia, coelhos e primatas não humanos (Janer *et al.*, 2008; Therapontos *et al.*, 2009; Ema *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2010; Cassina *et al.*, 2012; Mahony *et al.*, 2013; Beedie *et al.*, 2015, 2016a, 2016b, 2017; Macedo *et al.*, 2015; Cugola *et al.*, 2016; Darbellay *et al.*, 2017). A partir do estabelecimento de modelos experimentais em diferentes espécies, foi possível observar e definir os efeitos fenotípicos de determinados agentes teratogênicos (Tabela 2).

A definição da espécie animal a ser utilizada como modelo experimental para cada estudo é baseada em diferentes aspectos, como o tempo de desenvolvimento, acessibilidade aos órgãos e estruturas potencialmente afetados e suscetibilidade da espécie ao agente teratogênico (Cassina *et al.*, 2012). Além disso, aspectos relacionados a manutenção, facilidade de manipulação e limitações éticas também são considerados. Como a sensibilidade a cada agente teratogênico varia de acordo com as espécies, a escolha do modelo experimental animal deve levar em consideração a utilização de animais que são sensíveis aos efeitos teratogênicos do agente que será avaliado. Por exemplo, a sensibilidade à talidomida varia de acordo com a espécie, sendo os roedores menos sensíveis aos efeitos teratogênicos do fármaco, ao contrário dos embriões de galinha (Janer *et al.*, 2008; Vargesson, 2015).

Tabela 2. Exemplos de teratógenos cujos estudos em animais demonstram anomalias congênitas semelhantes às observadas em humanos.

Agente Teratogênico	Espécies	Fenótipos Relacionados	Referências
<i>Talidomida e seus análogos</i>	Embriões de <i>zebrafish</i> , galinha, PNH e roedores	Defeitos de membros	Therapontos <i>et al.</i> , 2009; Ema <i>et al.</i> , 2010; Ito <i>et al.</i> , 2010; Vargesson, 2019
<i>Ácido Valpróico</i>	Embriões de <i>zebrafish</i> , galinha e roedores	Redução de crescimento, malformações cardíacas, de formação de tubo neural e defeitos de membros	Whitsle <i>et al.</i> , 2002; Gilbert-Barness, 2010
<i>Ácido Retinóico</i>	Embriões de galinha	Malformações Oculares	Hyatt <i>et al.</i> , 1992; Vargesson and Fraga, 2017
<i>Cádmio</i>	Embriões de galinha, <i>zebrafish</i> e roedores	Defeitos de membros e malformações cardíacas e de formação de tubo neural	Cullinane <i>et al.</i> , 2009; Yamamoto <i>et al.</i> , 2012; Vargesson and Fraga, 2017
<i>Álcool</i>	Embriões de galinha	Malformações características de SAF	Smith, 2008; Ali Laghari <i>et al.</i> , 2015

Abreviaturas: PNH: Primatas não-humanos; SAF: Síndrome Alcoólica Fetal.

A utilização de animais vertebrados não mamíferos para experimentos relacionados a teratogênese experimental como embriões de *zebrafish* e de galinha é uma excelente alternativa. Além de minimizar o uso de mamíferos, que normalmente necessitam de uma estrutura mais complexa de cuidado animal, apresentam uma manipulação simplificada em relação a outros animais de maior porte e possuem o desenvolvimento semelhante ao dos

mamíferos, tornando possível a extrapolação dos achados em animais para humanos (Vargesson and Fraga, 2017).

Assim como em estudos observacionais realizados com humanos, a ética é fundamental e rege os princípios de uso dos animais como modelos experimentais para os estudos de teratogênese experimental. Para tanto, o Centro Nacional de Reutilização, Refinamento e Redução do Uso de Animais na Pesquisa (*National Center for Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research*, em inglês- NC3Rs; www.nc3rs.org.uk/) foi criado, executando o conceito dos 3Rs: substituição (*replacement*), redução (*reduction*) e refinamento (*refinement*) do uso de animais, primeiramente estabelecidos por Russell and Burch em 1959.

A substituição está relacionada a utilização de outros modelos sempre que possível, buscando acelerar o desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitem a redução do uso de animais. Já a redução de uso procura selecionar métodos que minimizem o número de animais envolvidos nos experimentos, buscando utilizar o menor número possível necessário para que o estudo seja replicável e robusto, o que pode ser realizado através de um desenho experimental adequado e um estudo piloto capaz de estimar o menor n amostral necessário (Russell and Burch, 1959).

Por fim, o refinamento do uso está relacionado com a minimização do sofrimento dos animais e a preocupação com a qualidade de vida dos mesmos. Dessa forma, respeitando todos princípios e com a aprovação de um Comitê de Ética, os estudos de teratogênese experimental utilizando animais como modelos experimentais podem ser realizados de forma adequada.

1.3. Embriões de galinha e seu uso na teratogênese experimental

Nos últimos 50 anos, os estudos com embriões de galinha (*Gallus gallus*) contribuíram muito para o avanço dos conhecimentos relacionados a biologia do desenvolvimento (Stern, 2004). Este modelo tem sido muito importante para a compreensão de mecanismos no desenvolvimento de órgãos e sistemas, como por exemplo de membros e sistema nervoso central (SNC) (Tickle *et al.*, 1975; Vargesson *et al.*, 1997; Lewandoski *et al.*, 2000; Stern, 2004; Davey and Tickle, 2007; Towers and Tickle, 2009; Vergara and Canto-Soler, 2012; Mahony and Vargesson, 2013). São também um modelo muito utilizado

para estudos relacionados a virologia e teratogênese experimental, como para a avaliação do potencial teratogênico de fármacos em desenvolvimento (Beedie *et al.*, 2016a; Dong and Liang, 2018). Além disso, são modelos interessantes para estudos com agentes teratogênicos que tenham efeitos no desenvolvimento do SNC, como por exemplo o ZIKV, já que apresentam um desenvolvimento de SNC correlato ao dos humanos (Wallis *et al.*, 2004; Stern, 2004).

A utilização de embriões de galinha como modelo experimental está baseada nas inúmeras vantagens que esse modelo animal apresenta. Além da facilidade de manipulação e de manutenção, a visualização *in vivo* proporciona o acompanhamento direto do desenvolvimento dos embriões (Davey and Tickle, 2007; Vergara and Canto-Soler, 2012; Bjornstad *et al.*, 2015). O embrião apresenta um tamanho ideal que permite sua visualização macroscópica e não possui influência do metabolismo materno, já que ocorre *in ovo*, o que também é interessante em termos éticos, já que não é necessário o sacrifício materno para a avaliação dos desfechos. Portanto, os embriões de galinha, além de serem muito importantes e efetivos para estudos com biologia do desenvolvimento e teratogênese experimental, também se enquadram no conceito dos 3Rs antes mencionado (Beedie *et al.*, 2017; Vargesson and Fraga, 2017; Davey *et al.*, 2018).

No que se refere às características de desenvolvimento embrionário, entre a fertilização e a eclosão do ovo são necessários apenas 21 dias. Nos três primeiros dias ocorrem a gastrulação, neurulação, o início da histogênese e em seguida se inicia a formação dos brotos dos membros e outros órgãos como olhos e cérebro (Hamburger and Hamilton, 1951; Davey *et al.*, 2018; Vilches-Moure, 2019). O estagiamento dos embriões de galinha se baseia na escala desenvolvida por Hamburger and Hamilton (1951), elaborada de acordo com importantes marcos do desenvolvimento desses animais. Os estágios facilitam a comparação dos períodos de desenvolvimento dos embriões de galinha e dos humanos, tornando possível a extrapolação dos achados nesses modelos animais para outras espécies.

Outra razão que evidencia a relevância deste modelo é que o genoma das galinhas, que foi o primeiro genoma de animais amnióticos não-mamíferos sequenciado (*Internacional Chicken Genome Sequencing Consortium*, 2004), compartilha um nível de complexidade transcricional similar ao do genoma dos humanos, apesar de apresentarem um número menor de genes (Cheng and Burt, 2018). Por outro lado, parte das limitações envolvidas no uso de embriões de galinha como modelo experimental estão relacionadas a

manipulação genética desses animais. Devido à dificuldade de acesso ao embrião nos primeiros estágios de fertilização e desenvolvimento, ainda com o ovo dentro da galinha, a utilização de técnicas como *knockout* de genes específicos através de recombinação homóloga se torna complicada. Porém, com a aplicação de novas técnicas de edição genômica, novas oportunidades de uso dos embriões de galinha estão sendo geradas (Stern, 2018). A aplicação de técnicas que sejam capazes de silenciar a expressão de determinados genes como siRNA (pequenos RNAs de interferência, *small interfering RNA*, em inglês), RNAi (RNAs de interferência, *interfering RNA*, em inglês) e RCAS (ALV LTR Competente para Replicação com Aceitador de Junção, *Replication Competent ALV LTR with a Splice acceptor*, em inglês), além de CRISPR/Cas9 (Agrupado com intervalos Regulares entre Repetições Palindrômicas Curtas com Proteína 9 Associada, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated- protein 9*, em inglês) são alternativas para superar as limitações desse modelo (Logan and Tabin, 1998; Krull, 2004; Stern, 2018; Williams *et al.*, 2018; Chojnacka-Puchta and Sawicka, 2020).

Os embriões de galinha têm sido utilizados na compreensão dos mecanismos de teratogênese de agentes teratogênicos como o ácido valpróico, o álcool, a cocaína, a nicotina e o ácido retinóico (Wiens *et al.*, 1992; Venturini and Sparber, 2001; Cullinane *et al.*, 2009; Hsieh *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2012; El-Beltagy *et al.*, 2015). Ademais, também são utilizados para estabelecimento de modelos experimentais de embriopatia ou síndromes causadas pela exposição a teratógenos, como em relação a Síndrome Congênita por ZIKV e a Embriopatia por Talidomida (Therapontos *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010; Ema *et al.*, 2010; Goodfellow *et al.*, 2016a; Thawani *et al.*, 2018). Nesse sentido, os embriões de galinha foram essenciais para a demonstração do potencial antiangiogênico da talidomida e de mecanismos relacionados a proteína Cereblon (Therapontos *et al.*, 2009; Vargesson, 2009; Ito *et al.*, 2010; Davey *et al.*, 2018).

1.4. Vírus Zika (ZIKV) e a Síndrome Congênita pelo Vírus Zika

O ZIKV foi primeiramente descrito em 1947, após ter sido isolado de amostras de sangue de macacos *Rhesus* (*Macaca mulata*) (Dick *et al.*, 1952). Como os demais flavivírus, é transmitido majoritariamente através dos vetores do gênero *Aedes*, porém sua transmissão pelas vias congênita, perinatal e sexual também é possível (Musso *et al.*, 2015; Cugola *et*

al., 2016; Plourde and Bloch, 2016). Durante muitos anos, apenas casos de infecções esporádicos e isolados foram registrados, sendo os primeiros casos de infecção em humanos reconhecidos em 1954 na Nigéria (Macnamara, 1954). Já a transmissão do ZIKV através do vetor urbano *Aedes aegypti* somente foi observada em 1966 na Malásia (Marchette *et al.*, 1969). Nos anos de 2007 e 2013 alguns surtos localizados foram registrados no Gabão, na África e nas Ilhas Yap e Guão, na Micronésia, Polinésia Francesa e outras ilhas na Oceania (Musso *et al.*, 2014; Weaver *et al.*, 2016). Em termos clínicos, a infecção por ZIKV é, na maioria das vezes, assintomática, porém quando sintomática, apresenta sintomas muito similares aos da infecção pelo vírus da dengue (DENV), caracterizada por erupções cutâneas, febre baixa e intermitente e dores musculares e de cabeça. Além disso, não tão frequentemente, a infecção por ZIKV pode ter consequências mais severas como a síndrome de Guillain-Barré (Zanluca *et al.*, 2015; Cao-Lormeau *et al.*, 2016).

A infecção por ZIKV passou a ter notoriedade e relevância em 2015, quando uma epidemia foi registrada na região Nordeste do Brasil. A epidemia de infecção por ZIKV foi acompanhada por um aumento significativo dos casos de crianças nascidas com microcefalia, o que chamou atenção e levantou a hipótese de que esses fatos estariam relacionados (Marrs *et al.*, 2016; Bautista, 2018). Em 2016, essa associação foi confirmada através da aplicação dos critérios de Shepard e de Bradford-Hill (Rasmussen *et al.*, 2016). A exposição à infecção por ZIKV durante a gestação foi relacionada a uma síndrome malformativa com dano cerebral importante onde microcefalia era a característica mais frequente, conhecida atualmente como Síndrome Congênita pelo Vírus Zika (SCZ) (Schuler-Faccini *et al.*, 2016a e b; de Araújo *et al.*, 2016; Del Campo *et al.*, 2017).

A SCZ é caracterizada principalmente pelo acometimento do SNC, podendo apresentar fenótipos de menor ou maior gravidade, indicando que o ZIKV é capaz de induzir a disrupção do desenvolvimento do SNC (Schuler-Faccini *et al.*, 2016b; Del Campo *et al.*, 2017). Além disso, o acometimento do SNC geralmente é acompanhado por deficiências motoras, além de graves manifestações neuro-cognitivas (Del Campo *et al.*, 2017).

Nesse sentido, é importante salientar que assim como os demais agentes teratogênicos e de acordo com as premissas postuladas por Wilson (1973), nem todos os indivíduos expostos a infecção por ZIKV durante a gestação apresentam desfechos relacionados com SCZ. Efetivamente, apenas cerca de 45% das crianças expostas nascem com algum fenótipo relacionado com a síndrome (Schuler-Faccini *et al.*, 2016a; Del Campo

et al., 2017). Fatores genéticos também estão relacionados com a maior suscetibilidade a desfechos mais severos após a exposição ao ZIKV durante o desenvolvimento (Santos *et al.*, 2019; Gomes *et al.*, 2021; de O da Silva *et al.*, 2021). Além disso, estudos sugerem que condições maternas, como desnutrição, também podem estar relacionadas a maior suscetibilidade a SCZ e severidade dos desfechos, o que poderia ser um cofator para a maior incidência de casos de SCZ em determinadas regiões do Brasil com menor poder econômico (Gilbert-Jaramillo *et al.*, 2019; Barbeito-Andrés *et al.*, 2020).

1.5. Modelos experimentais em ZIKV: achados morfológicos e de mecanismos de teratogênese

Experimentos *in vitro* e *in vivo* vem sendo fundamentais para a compreensão dos mecanismos de ação do ZIKV responsáveis pela indução da disrupção do desenvolvimento do SNC e dos demais fenótipos relacionados a SCZ (Pena *et al.*, 2018). Estudos com culturas celulares e com organoides demonstram que o ZIKV infecta células pluripotentes, ativando sua diferenciação prematura, além de indução de morte celular, ocasionando a redução da multiplicação celular antes da diferenciação e gerando uma posterior diminuição no número celular, o que levaria a uma consequente redução na espessura de regiões cerebrais (Qian *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016 Gabriel *et al.*, 2017). Apesar do estabelecimento de alguns mecanismos importantes para a geração dos efeitos teratogênicos observados após a exposição ao ZIKV durante o desenvolvimento, ainda há muitas perguntas a serem respondidas.

O estabelecimento de modelos experimentais *in vivo* utilizando diferentes espécies animais está sendo fundamental para a compreensão não só dos mecanismos envolvidos na teratogênese do ZIKV, mas também para a geração de conhecimentos relacionados a biologia do vírus, podendo ter variadas implicações, incluindo desenvolvimento de vacinas (Caine *et al.*, 2018; Pena *et al.*, 2018; Nazerai *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019). Os principais modelos animais experimentais utilizados para estudos relacionados ao ZIKV e seus principais achados morfológicos e relacionados a mecanismos de teratogênese do vírus estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3: Principais modelos animais utilizados para estudos com ZIKV.

Principais Modelos para ZIKV	Achados Morfoanatômicos	Achados Patológicos	Achados Moleculares	Referências
<i>Roedores</i>	Microcefalia, malformações oculares e displasia hipocampal	Disrupção da neurogênese, desenvolvimento vascular anormal, ativação da microglia, desregulação do ciclo celular e apoptose	Redução da expressão de genes relacionados a microcefalia e neurogênese cortical; aumento da expressão de genes relacionados a resposta imune, apoptose, resposta antiviral, de receptores de flavivírus, de resposta a hipóxia e da via do interferon	Cugola <i>et al.</i> , 2016; Grant <i>et al.</i> , 2016; Li <i>et al.</i> , 2016; Shao <i>et al.</i> , 2016; Wu <i>et al.</i> , 2016; Vermillion <i>et al.</i> , 2017; Xavier-Neto <i>et al.</i> , 2017; Garcez <i>et al.</i> , 2018; Shi <i>et al.</i> , 2018; Yockey <i>et al.</i> , 2018; Khaiboullina <i>et al.</i> , 2019; Liang <i>et al.</i> , 2019; Rathore <i>et al.</i> , 2019; Barbeito-Andrés <i>et al.</i> , 2020
<i>PNH</i>	Lesões cerebrais, diminuição do crescimento fetal e displasia de retina	Microcalcificações, gliose periventricular, redução da proliferação das células neuroprogenitoras e necrose neuronal		Adams Waldorf <i>et al.</i> , 2016; Adams Waldorf <i>et al.</i> , 2018; Gurung <i>et al.</i> , 2018; Martinot <i>et al.</i> , 2018; Mohr <i>et al.</i> , 2018; Rayner <i>et al.</i> , 2018; Gurung <i>et al.</i> , 2019
<i>Porcos</i>	Menor peso e estatura ao nascimento e microcefalia	Neuropatologia, depleção de neurônios no córtex	Superexpressão de genes de vias de resposta antiviral e da via do interferon; Redução da expressão de genes relacionados a mitose	Darbellay <i>et al.</i> , 2017; Wichgers <i>et al.</i> , 2018; Udenze <i>et al.</i> , 2019

continuação

<i>Embriões de Galinha</i>	Redução de crescimento e diminuição do perímetro encefálico e fenótipos dimórficos do ouvido interno	Alteração da expressão de <i>shh</i> , <i>bmp7</i> e <i>fgf8</i>	Goodfellow <i>et al.</i> , 2016; Willard <i>et al.</i> , 2017; Cairns <i>et al.</i> , 2018; Thawani <i>et al.</i> , 2018; Thawani <i>et al.</i> , 2020
----------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Abreviaturas: PNH: Primatas não-humanos; *shh*: Proteína *Sonic Hedgehog*; *bmp7*: Proteína Morfogenética do Osso; *fgf8*: Fator de Crescimento de Fibroblasto 8.

Apesar de não serem naturalmente suscetíveis a infecção por ZIKV, os roedores aparecem como sendo os modelos animais mais utilizados para diferentes abordagens relacionadas ao vírus (Cugola *et al.*, 2016). A utilização de animais *knockout* imunossuprimidos devido a uma deficiência na via de sinalização do interferon (IFN) é uma das estratégias aplicadas para tornar esses animais suscetíveis a infecção pelo ZIKV (Grant *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019). Além disso, a utilização de doses maiores de vírus também é uma alternativa para transpor a limitação do uso de roedores, assim como a utilização de drogas imussupressoras (Cugola *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Xavier-Neto *et al.*, 2017).

A frequência de uso desses animais se deve principalmente por apresentarem uma série de vantagens como baixo custo, tempo de reprodução curto, ninhadas numerosas e facilidade de manuseio e manutenção (Caine *et al.*, 2018). A confirmação da transmissão vertical do ZIVK e seus efeitos embrionários/fetais em animais foi primeiramente demonstrada utilizando camundongos como modelo (Cugola *et al.*, 2016). Desde então, muitos outros estudos utilizando roedores foram realizados (Tabela 3), gerando conhecimentos importantes principalmente relacionados a patogênese do ZIKV. Apesar da importância desse modelo experimental, existem limitações em relação a extrapolação dos achados para humanos devido às diferenças fisiológicas, estruturais e imunológicas entre esses organismos (Xu *et al.*, 2019). Nesse contexto, a utilização de modelos animais experimentais mais próximos evolutivamente dos humanos é fundamental, como é o caso dos primatas não-humanos.

Os primatas não-humanos, apesar de apresentarem limitações relacionadas com a sua manutenção, custo e questões éticas, são de importância fundamental em estudos da teratologia do ZIKV. Sua utilização está muito relacionada à similaridade desses organismos com os humanos no que diz respeito à fisiologia, placentação e relação materna-fetal (Hendrickx and Binkerd, 1990; Pena *et al.*, 2018; Mohr, 2018). Muitos achados morfológicos importantes foram observados utilizando principalmente macacos *Rhesus* (*Macaca mulatta*) e babuínos (*Papio anubis*; Tabela 3; Adams Waldorf *et al.*, 2016; Adams Waldorf *et al.*, 2018; Gurung *et al.*, 2018; Martinot *et al.*, 2018; Mohr *et al.*, 2018; Gurung *et al.*, 2019). Um campo emergente atualmente é a utilização de primatas não-humanos (PNH) para a compreensão dos efeitos em longo prazo no neurodesenvolvimento da exposição à infecção pelo ZIKV durante a gestação, completando observações clínicas em humanos (Mohr, 2018).

Outros modelos experimentais alternativos também têm sido utilizados para o entendimento das vias moleculares afetadas por ZIKV. Por apresentarem fisiologia bastante similar a dos humanos, os porcos são um bom modelo para o estudo das alterações morfológicas causadas pela infecção pelo ZIKV (Meurens *et al.*, 2012). Adicionalmente aos achados morfológicos (Tabela 3), Darbellay e colaboradores (2017) também identificaram a superexpressão de genes relacionados a vias de resposta antiviral e de produção de interferon e a redução da expressão de genes relacionados a mitose.

Os embriões de galinha, por apresentarem várias vantagens em seu uso (já citadas anteriormente na sessão 1.7.), vêm sendo utilizados para o estabelecimento de modelos experimentais de SCZ e para o entendimento dos mecanismos teratogênicos do ZIKV (Goodfellow *et al.*, 2016; Willard *et al.*, 2017; Cairns *et al.*, 2018; Thawani *et al.*, 2018; Thawani *et al.*, 2020). Interessantemente, logo após a identificação do ZIKV em 1947, estudos utilizando embriões de galinha foram realizados para a compreensão da sua biologia (Taylor, 1952). Os embriões de galinha também foram a ferramenta utilizada para o estabelecimento de modelos experimentais da SCZ, corroborando com os demais dados observados em humanos e gerados através de estudos utilizando outros animais como modelo experimental (Goodfellow *et al.*, 2016; Willard *et al.*, 2017; Cairns *et al.*, 2018; Thawani *et al.*, 2018; Thawani *et al.*, 2020).

Através do estudo de Goodfellow e colaboradores (2016) foi comprovado que os embriões de galinha são suscetíveis e permissíveis a infecção por ZIKV, além de terem

conseguido demonstrar que a injeção direta de ZIKV no encéfalo em desenvolvimento causava também efeitos letais e dano progressivo ao SNC. Willard e colaboradores, também utilizando embriões de galinha como modelo experimental, e também utilizando uma estratégia de infecção por injeção direta no SNC, avaliaram o tempo de sobrevivência dos embriões expostos a infecção. Em termos de mecanismos de teratogênese, Thawani e colaboradores (2018) demonstraram que o vírus causa a redução da expressão de morfógenos importantes para o desenvolvimento encefálico (Tabela 3). Mais recentemente, esse mesmo grupo publicou um novo estudo sobre os efeitos da injeção de ZIKV diretamente na orelha interna em desenvolvimento (Thawani *et al.*, 2020), onde demonstraram que a infecção pelo ZIKV pode levar a fenótipos dimórficos nesta região do órgão. Assim, a deficiência auditiva apresentada por algumas crianças com SCZ pode ser devida não só a interrupção do desenvolvimento do SNC, mas também a efeitos do vírus diretamente na orelha em desenvolvimento (Thawani *et al.*, 2020). Cairns e colaboradores (2018) estabeleceram também um modelo experimental para testar o potencial de niclosamida, um anti-helmíntico, em reduzir os efeitos de ZIKV no desenvolvimento encefálico desses embriões. Neste estudo, utilizando uma estratégia de infecção diferenciada, por meio da inoculação de células neuroprogenitoras diretamente no mesencéfalo em desenvolvimento, foi observado que a niclosamida é capaz de reduzir os danos causados pela exposição a infecção (Cairns *et al.*, 2018).

Estes estudos, ainda que muito importantes, apresentam algumas limitações. Todos os modelos apresentam uma forma de inoculação invasiva. Os embriões são sensíveis, visto que estão em pleno desenvolvimento e, ademais da ação teratogênica do vírus, uma manipulação realizada de forma inadequada ou muito invasiva pode ser fatal e acrescentar muitos vieses ao experimento. Ademais, esses estudos se centram principalmente na avaliação dos efeitos da exposição ao ZIKV no SNC e acabam por não realizar uma análise morfológica completa. A falta de uma análise morfológica completa acaba ocasionando também a falta de uma análise molecular completa, que será fundamental para a determinação dos mecanismos teratogênicos envolvidos nos fenótipos relacionados a infecção por ZIKV durante o desenvolvimento.

CAPÍTULO 2

Justificativa e Objetivo

2.1. Justificativa

Apesar de a epidemia de casos de infecção por ZIKV e o conseqüente aumento de casos de microcefalia terem ocorrido em 2015, tragédia que acometeu milhares de indivíduos, e atualmente as taxas de infecção estarem declínio, foram registrados no Brasil 609 casos prováveis em gestantes, desses apenas 214 confirmados em 2020 de acordo com dados do Ministério da Saúde (Boletim Epidemiológico 3, 2021). Além disso, há muitas regiões brasileiras que não foram atingidas pelas primeiras ondas de 2015 e 2016, havendo significativa parte da população não imune ao vírus (Netto *et al.*, 2017). Logo, a possibilidade de ocorrência de epidemias localizadas em outras regiões, como a região Sul, pouco atingida inicialmente, é preocupante.

Ainda não há uma vacina efetiva para o ZIKV e as mudanças climáticas ocasionadas pelo aquecimento global preocupam, já que o mosquito *Aedes aegypti* vem se adaptando a diferentes habitats e pode vir a se instalar em novas regiões (Reinhold *et al.*, 2018; Lwande *et al.*, 2019). Assim, com a propagação do vetor, as doenças por ele transmitidas também podem propagar-se, acometendo novas populações (Brady and Hay, 2019).

Portanto, são necessários estudos que objetivem compreender melhor os efeitos do ZIKV sobre o desenvolvimento embrionário através de uma descrição morfológica mais detalhada, bem como entender os mecanismos teratogênicos da SCZ, gerando assim a possibilidade de prevenção dos possíveis efeitos teratogênicos da exposição ao vírus durante a gestação. Nesse sentido, o estabelecimento de modelos experimentais para estudos *in vivo* é uma ferramenta fundamental e que pode ser aplicada e utilizada para a geração de diferentes conhecimentos.

2.2. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estabelecer um modelo experimental para a Síndrome Congênita por ZIKV utilizando embriões de galinha.

2.3. Objetivos Específicos

- a) Estabelecer o modelo experimental infectando os embriões de forma não invasiva;
- b) Testar diferentes titulações virais para a definição da titulação ideal para os experimentos;
- c) Analisar os efeitos teratogênicos de ZIKV em embriões de galinha em desenvolvimento, focando em alterações morfológicas causadas pela infecção.
- d) Avaliar a cinética da infecção viral, bem como o aparecimento de malformações ao longo dos primeiros cinco dias após a infecção.

CAPÍTULO 3

Artigo Publicado: Zika virus-induced brain malformations in chicken embryos

Wachholz GE, Varela APM, Teixeira TF, de Matos SMS, Rigon da Luz Soster P, Vianna FSL, de Souza DOG, Roehe PM, Schuler-Faccini L, Fraga LR (2021) Zika virus-induced brain malformations in chicken embryos. Birth Defects Res 113:22-31.

DOI: 10.1002/bdr2.1813

Abstract

Background: Zika virus (ZIKV) was confirmed to be related to microcephaly in 2016. However, there is still a need for understanding the embryonic morphological changes induced by ZIKV and when they occur. Here, chicken embryos were chosen as experimental model of ZIKV to evaluate virus-associated morphological alterations that might take place during embryonic development.

Methods: A screening with different viral doses was conducted in embryos at HH Stage 10-12 (E1.5) as well as a follow up of the first 5 days postinfection (dpi) was performed to observe the main morphologic changes post ZIKV infection.

Results: ZIKV exposed embryos presented a higher prevalence of mortality and defects such as brain malformation when compared to controls. Moreover, we observed that the phenotypes become more evident at 4dpi, when the viral load quantification reaches a peak.

Conclusions: We found that ZIKV exposed embryos presented a high prevalence of mortality and central nervous system (CNS) abnormalities in a dose-dependent manner. The phenotype was more evident 4 days postinfection, when the viral load quantification reached a peak.

Keywords: bird; birth defects; cell culture; congenital ZIKV syndrome; embryo manipulation; encephalon; reduction.

CAPÍTULO 4
Considerações Finais

Neste trabalho estabelecemos um modelo experimental para a Síndrome Congênita por ZIKV através de uma abordagem de infecção alternativa e menos invasiva quando comparada às comumente usadas em estudos de embriões de galinha. Através da aplicação viral sobre o embrião e não por meio de injeção direta no SNC ou na camada subgerminativa, como realizado nos demais trabalhos utilizando este modelo experimental (Goodfellow *et al.*, 2016; Willard *et al.*, 2017; Cairns *et al.*, 2018; Thawani *et al.*, 2018; Thawani *et al.*, 2020), foi possível a geração de malformações muito semelhantes aos encontrados em pacientes expostos pela infecção do ZIKV ao longo da gestação. Diferentemente dos demais trabalhos citados, que apenas demonstraram alterações de tamanho das estruturas do SNC, como redução do perímetro encefálico ou do mesencéfalo, o presente modelo experimental foi importante para a demonstração de malformações efetivas e não somente no SNC, mas também em outros órgãos, como os olhos.

Para o estabelecimento do modelo foram testadas várias titulações virais visando a definição da melhor titulação em termos de desfecho, ou seja, uma titulação viral capaz de causar as malformações almeçadas, porém sem que houvesse uma taxa de mortalidade alta dos embriões. Através da realização de uma avaliação fenotípica, foi definida então que a titulação 3×10^4 Unidades Formadoras de Placa (PFU) de ZIKV era a ideal para o seguimento dos demais experimentos.

Cabe salientar também que além de ser diferente na abordagem de infecção, esse trabalho foi o primeiro a realizar um acompanhamento fenotípico ao longo de cinco dias após a infecção viral, sendo possível a observação da cinética de infecção e os momentos críticos para a evidenciação das malformações. Nesse contexto, o quarto dia após a infecção por ZIKV é importante pois é quando se observou um pico da replicação viral e também o momento em que as malformações observadas nos embriões infectados se tornam mais evidentes. A partir do estabelecimento desse novo modelo e já compreendendo melhor a cinética de infecção, é possível utilizar ferramentas para compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na ação teratogênica do vírus, principalmente por meio da avaliação da expressão de diferentes genes que possam estar envolvidos.

A partir deste modelo experimental utilizando uma estratégia de infecção menos invasiva e que estabeleceu os momentos críticos de replicação viral e aparecimento das malformações, será possível executar diferentes investigações relacionadas a mecanismos e

avaliação de compostos com potencial de reduzir e resgatar os danos causados pelo ZIKV. Assim, estudos de expressão gênica, metilação e proteômica são perspectivas desse trabalho.

Portanto, aqui estabelecemos um modelo experimental para SCZ utilizando embriões de galinha e por meio de uma estratégia de infecção menos invasiva quando comparada as utilizadas pelos demais trabalhos. O modelo estabelecido será fundamental para continuar desvendando os mecanismos moleculares envolvidos na teratogenicidade do ZIKV. A partir do conhecimento dos mecanismos de teratogênese do vírus, novas estratégias de prevenção e de resgate das malformações resultantes à exposição poderão ser desenvolvidas, contribuindo para a prevenção de AC na população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams Waldorf KM, Stencel-Baerenwald JE, Kapur RP, Studholme C, Boldenow E, Vornhagen J, Baldessari A, Dighe MK, Thiel J, Merillat S *et al.* (2016) Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. *Nat Med* 22:1256-1259.

Adams Waldorf KM, Nelson BR, Stencel-Baerenwald JE, Studholme C, Kapur RP, Armistead B, Walker CL, Merillat S, Vornhagen J, Tisoncik-Go J *et al.* (2018) Congenital Zika virus infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain. *Nat Med* 24:368-374.

Ali Laghari Z, Ali Samo A, Waryani B, Ali Palh Z, Hussain Lashari K, Murtaza Mastoi G, Ara Sahato G and Jabeen Ursani T (2015) Effects of a single dose of ethanol on survival rate and angiogenesis of chick embryo. *Animal and Veterinary Sciences* 3:8–11.

Altıntaş Aykan D and Ergün Y (2020) Isotretinoin: Still the cause of anxiety for teratogenicity. *Dermatol Ther* 33:e13192.

Andreasen KR, Andersen ML and Schantz AL (2004) Obesity and pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83:1022-9.

Barbeito-Andrés J, Pezzuto P, Higa LM, Dias AA, Vasconcelos JM, Santos TMP, Ferreira JCCG, Ferreira RO, Dutra FF, Rossi AD *et al.* (2020) Congenital Zika syndrome is associated with maternal protein malnutrition. *Sci Adv* 6:eaaw6284.

Bautista LE (2018) Maternal Zika virus infection and newborn microcephaly—an analysis of the epidemiological evidence. *Annals of Epidemiology* 28:111–118.

Beedie SL, Peer CJ, Pisle S, Gardner ER, Mahony C, Barnett S, Ambrozak A, Gütschow M, Chau CH, Vargesson N *et al.* (2015) Anticancer Properties of a Novel Class of Tetrafluorinated Thalidomide Analogues. *Mol Cancer Ther* 14:2228-37.

Beedie SL, Rore HM, Barnett S, Chau CH, Luo W, Greig NH, Figg WD and Vargesson N (2016a) In vivo screening and discovery of novel candidate thalidomide analogs in the zebrafish embryo and chicken embryo model systems. *Oncotarget* 7:33237-45.

Beedie SL, Mahony C, Walker HM, Chau CH, Figg WD and Vargesson N (2016b) Shared mechanism of teratogenicity of anti-angiogenic drugs identified in the chicken embryo model. *Sci Rep* 6:30038.

- Beedie SL, Diamond AJ, Fraga LR, Figg WD and Vargesson N (2017) Vertebrate embryos as tools for anti-angiogenic drug screening and function. *Reprod Toxicol* 70:49-59.
- Benke PJ (1984) The isotretinoin teratogen syndrome. *JAMA* 251:3267-9.
- Bjornstad S, Austdal LPE, Roald B, Glover JC and Paulsen RE (2015) Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 355:386–396.
- Boletim Epidemiológico 3: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, Chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020, https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf (13 de Junho de 2021).
- Brady OJ and Hay SI (2019) The Global Expansion of Dengue: How *Aedes aegypti* Mosquitoes Enabled the First Pandemic Arbovirus. *Annu Rev Entomol* 65:191-208.
- Brent RL (2001). The cause and prevention of human birth defects: what have we learned in the past 50 years?. *Congenital anomalies* 41:3-21.
- Cain MA, Bornick P and Whiteman V (2013) The maternal, fetal, and neonatal effects of cocaine exposure in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 56:124-32.
- Caine EA, Jagger BW and Diamond MS (2018) Animal Models of Zika Virus Infection during Pregnancy. *Viruses* 10:598.
- Cairns DM, Boorgu DSSK, Levin M and Kaplan DL (2018) Niclosamide rescues microcephaly in a tollhumanized *in vivo* model of Zika infection using human induced neural stem cells. *Biol Open* 7:bio031807.
- Cassina M, Salviati L, Di Gianantonio E and Clementi M (2012) Genetic susceptibility to teratogens: state of the art. *Reprod Toxicol* 34:186-91.
- Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, Dub T, Baudouin L, Teissier A, Larre P *et al.* (2016) Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* 387:1531-1539.
- Cheng Y and Burt DW (2018) Chicken genomics. *Int J Dev Biol* 62:265-271.

Chiopris G, Veronese P, Cusenza F, Procaccianti M, Perrone S, Daccò V, Colombo C and Esposito S (2020) Congenital Cytomegalovirus Infection: Update on Diagnosis and Treatment. *Microorganisms* 8:1516.

Chojnacka-Puchta L and Sawicka D (2020) CRISPR/Cas9 gene editing in a chicken model: current approaches and applications. *J Appl Genet* 61:221-229.

Christian MS and Hoberman AM (1996) Perspectives on the U.S., EEC, and Japanese developmental toxicity testing guidelines. In: Hood RD, editor. *Handbook of Developmental Toxicology*. Boca Raton: CRC Press, pp 551–95.

Christianson A, Howson CP and Modell B (2006) *March of Dimes Global Report on birth defects: the hidden toll of dying and disabled children*. New York: March of Dimes Birth Defects Foundation, White Plains, <https://www.marchofdimes.org/global-report-on-birth-defects-the-hidden-toll-of-dying-and-disabled-children-full-report.pdf> (11 de Junho de 2021).

Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimarães KP, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, Romero S *et al.* (2016) The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 534:267-71.

Cullinane J, Bannigan J and Thompson J (2009) Cadmium teratogenesis in the chick: period of vulnerability using the early chick culture method, and prevention by divalent cations. *Reproductive Toxicology* 28:335–341.

Darbellay J, Cox B, Lai K, Delgado-Ortega M, Wheler C, Wilson D, Walker S, Starrak G, Hockley D, Huang Y *et al.* (2017) Zika Virus Causes Persistent Infection in Porcine Conceptuses and may Impair Health in Offspring. *EBioMedicine* 25:73-86.

Davey MG and Tickle C (2007) The chicken as a model for embryonic development. *Cytogenet Genome Res* 117:231-9.

de Araújo TVB, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda-Filho D, Montarroyos UR, de Melo APL, Valongueiro S, de Albuquerque MFPM, Souza WV, Braga C *et al.* (2016) Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis* 16:1356-1363.

- Dejong K, Olyaei A and Lo JO (2019) Alcohol Use in Pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 62:142-155.
- Del Campo M, Feitosa IM, Ribeiro EM, Horovitz DD, Pessoa AL, França GV, García-Alix A, Doriqui MJ, Wanderley HY, Sanseverino MV *et al.* (2017) The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. *Am J Med Genet A* 173:841-857.
- de O da Silva LR, Oliveira P, Sardi S, Soares G, Bandeira AC, Costa RDS, Rafaels N, Campbell M, Brunetti T, Crooks K *et al.* (2021) Zika Virus Congenital Syndrome and *MTOR* gene variants: insights from a family of dizygotic twins. *Heliyon* 7:e06878.
- Diav-Citrin O, Shechtman S, Bar-Oz B, Cantrell D, Arnon J and Ornoy A (2008) Pregnancy outcome after in utero exposure to valproate: evidence of dose relationship in teratogenic effect. *CNS Drugs* 22:325-34.
- Dick GW, Kitchen SF and Haddow AJ (1952) Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46:509–520.
- Dicke JM (1989) Teratology: principles and practice. *Med Clin North Am* 73:567-82.
- Dong S and Liang Q (2018) Recent Advances in Animal Models of Zika Virus Infection. *Virologica Sinica* 33:125–130.
- Dreier JW, Andersen AM and Berg-Beckhoff G (2014) Systematic review and meta-analyses: fever in pregnancy and health impacts in the offspring. *Pediatrics* 133:e674-88.
- El-Beltagy Ael-F, Abou-El-Naga AM and Sabry DM (2015) Neurotoxicological effects of nicotine on the embryonic development of cerebellar cortex of chick embryo during various stages of incubation. *Tissue Cell* 47:506-14.
- Ema M, Ise R, Kato H, Oneda S, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Singh AV, Knudsen TB and Ihara T (2010) Fetal malformations and early embryonic gene expression response in cynomolgus monkeys maternally exposed to thalidomide. *Reprod Toxicol* 29:49-56.
- Fa F, Laup L, Mandelbrot L, Sibiude J and Picone O (2020) Fetal and neonatal abnormalities due to congenital herpes simplex virus infection: a literature review. *Prenat Diagn* 40:408-414.
- Fallahi S, Rostami A, Nourollahpour Shiadeh M, Behniafar H and Paktinat S (2018). An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. *J Gynecol Obstet Hum Reprod* 47:133-140.

Fraga, LR, Diamond, AJ and Vargesson, N (2016) Thalidomide and birth defects. *eLS* 1-11.

Gabriel E, Ramani A, Karow U, Gottardo M, Natarajan K, Gooi LM, Goranci-Buzhala G, Krut O, Peters F, Nikolic M *et al.* (2017) Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids. *Cell Stem Cell* 20:397-406.e5.

Garcez PP, Stolp HB, Sravanam S, Christoff RR, Ferreira JCCG, Dias AA, Pezzuto P, Higa LM, Barbeito-Andrés J, Ferreira RO *et al.* (2018) Zika virus impairs the development of blood vessels in a mouse model of congenital infection. *Sci Rep* 8:12774.

George S, Viswanathan R and Sapkal GN (2019) Molecular aspects of the teratogenesis of rubella virus. *Biol Res* 52:47.

Gilbert-Barness E (2010) Teratogenic causes of malformations. *Ann Clin Lab Sci* 40:99-114.

Gilbert-Jaramillo J, Garcez P, James W, Molnár Z and Clarke K (2019) The potential contribution of impaired brain glucose metabolism to congenital Zika syndrome. *J Anat* 235:468-480.

Gomes JA, Sgarioni E, Boquett JA, Terças-Trettel ACP, da Silva JH, Ribeiro BFR, Galera MF, de Oliveira TM, Carvalho de Andrade MDF, Carvalho IF *et al.* (2021) Association between Genetic Variants in *NOS2* and *TNF* Genes with Congenital Zika Syndrome and Severe Microcephaly. *Viruses* 13:325.

Goodfellow FT, Tesla B, Simchick G, Zhao Q, Hodge T, Brindley MA and Stice SL (2016) Zika Virus Induced Mortality and Microcephaly in Chicken Embryos. *Stem Cells Dev* 25:1691-1697.

Gouin K, Murphy K and Shah PS (2011) Effects of cocaine use during pregnancy on low birthweight and preterm birth: systematic review and metaanalyses. *Am J Obstet Gynecol* 204:340.e1-12.

Gould GS, Havard A and Lim LL (2020) Exposure to Tobacco, Environmental Tobacco Smoke and Nicotine in Pregnancy: A Pragmatic Overview of Reviews of Maternal and Child Outcomes, Effectiveness of Interventions and Barriers and Facilitators to Quitting. *Int J Environ Res Public Health* 17:2034.

Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, Schwarz MC, Sánchez-Seco MP, Evans MJ, Best SM *et al.* (2016) Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe* 19:882-90.

Gregg NM (1941) Congenital cataract following german measles in the mother. *Transactions of the Ophthalmological Society of Australia* v. 3, pp 35–46.

Gurung S, Preno AN, Dubaut JP, Nadeau H, Hyatt K, Reuter N, Nehete B, Wolf RF, Nehete P, Dittmer DP *et al.* (2018) Translational Model of Zika Virus Disease in Baboons. *J Virol* 92:e00186-18.

Gurung S, Reuter N, Preno A, Dubaut J, Nadeau H, Hyatt K, Singleton K, Martin A, Parks WT, Papin JF *et al.* (2019) Zika virus infection at mid-gestation results in fetal cerebral cortical injury and fetal death in the olive baboon. *PLoS Pathog* 15:e1007507.

Hale F (1935) The relation of vitamin A to anophthalmos in pigs. *American Journal of Ophthalmology* 18:1087-1093.

Hamburguer V and Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.

Hendrickx AG and Binkerd PE (1990) Nonhuman primates and teratological research. *J Med Primatol* 19(2):81-108.

Hsieh CL, Wang HE, Tsai WJ, Peng CC and Peng RY (2012) Multiple point action mechanism of valproic acid-teratogenicity alleviated by folic acid, vitamin C, and N-acetylcysteine in chicken embryo model. *Toxicology* 291:32-42.

Hyatt GA, Schmitt EA, Marsh-Armstrong NR and Dowling JE (1992) Retinoic acid-induced duplication of the zebrafish retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8293-7.

International Chicken Genome Sequencing Consortium (2004) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432: 695-716.

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y and Handa H (2010) Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* 327:1345–1350.

Janer G, Slob W, Hakkert BC, Vermeire T and Piersma AH (2008) A retrospective analysis of developmental toxicity studies in rat and rabbit: what is the added value of the rabbit as an additional test species? *Regul Toxicol Pharmacol* 50:206-17.

Jentink J, Loane MA, Dolk H, Barisic I, Garne E, Morris JK and de Jong-van den Berg LT (2010) Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. *N Engl J Med* 362:2185-93.

Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J and Gibbs R (2001) Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv* 56:296-305.

Kalter H and Warkany J (1983) Congenital malformations (second of two parts). *N Engl J Med* 308:491-7.

Kaushik A, Verma S and Kumar P (2018) Congenital rubella syndrome: A brief review of public health perspectives. *Indian J Public Health* 62:52-54.

Khaiboullina SF, Lopes P, de Carvalho TG, Real ALCV, Souza DG, Costa VV, Teixeira MM, Bloise E, Verma SC and Ribeiro FM (2019) Host Immune Response to ZIKV in an Immunocompetent Embryonic Mouse Model of Intravaginal Infection. *Viruses* 11:558.

Kowalski TW, Sanseverino MT, Schuler-Faccini L and Vianna FS (2015) Thalidomide embryopathy: Follow-up of cases born between 1959 and 2010. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 103:794-803.

Krull CE (2004) A primer on using in ovo electroporation to analyze gene function. *Dev Dyn* 229:433-9.

Lewandoski M, Sun X and Martin GR (2000) Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* 26:460-3.

Li C, Wang Q, Jiang Y, Ye Q, Xu D, Gao F, Xu JW, Wang R, Zhu X, Shi L *et al.* (2016) Disruption of glial cell development by Zika virus contributes to severe microcephalic newborn mice. *Cell Discov* 4:43.

Liang H, Tang J, Liu Z, Liu Y, Huang Y, Xu Y, Hao P, Yin Z, Zhong J, Ye L *et al.* (2019) ZIKV infection induces robust Th1-like Tfh cell and long-term protective antibody responses in immunocompetent mice. *Nat Commun* 10:3859.

- Logan M and Tabin C (1998) Targeted gene misexpression in chick limb buds using avian replication-competent retroviruses. *Methods* 14:407-20.
- Lwande OW, Obanda V, Lindström A, Ahlm C, Evander M, Näslund J and Bucht G (2020) Globe-Trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Risk Factors for Arbovirus Pandemics. *Vector Borne Zoonotic Dis* 20:71-81.
- Macedo JS, Rocha BP, Colodel EM, Freitas SH, Dória RG, Riet-Correa F, Evêncio-Neto J and Mendonça FS (2015) Congenital malformations caused by *Stryphnodendron fissuratum* (Leg. Mimosoideae) in guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Toxicon* 106:68-71.
- Macnamara FN (1954) Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 48:139–145.
- Mahony C, Erskine L, Niven J, Greig NH, Figg WD and Vargesson N (2013) Pomalidomide is nonteratogenic in chicken and zebrafish embryos and nonneurotoxic in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:12703-8.
- Mahony C and Vargesson N (2013). Molecular analysis of regulative events in the developing chick limb. *J Anat* 223:1-13.
- Marchette NJ, Garcia R and Rudnick A (1969) Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* 18:411–415.
- Marrs C, Olson G, Saade G, Hankins G, Wen T, Patel J and Weaver S. Zika Virus and Pregnancy: A Review of the Literature and Clinical Considerations. *Am J Perinatol* 33:625-39.
- Martinez-Gomez E, Perez-Carpena P, Flook M and Lopez-Escamez JA (2020) A Systematic Review on the Association of Acquired Human Cytomegalovirus Infection with Hearing Loss. *J Clin Med* 9:4011.
- Martinot AJ, Abbink P, Afacan O, Prohl AK, Bronson R, Hecht JL, Borducchi EN, Larocca RA, Peterson RL, Rinaldi W *et al.* (2018) Fetal Neuropathology in Zika Virus-Infected Pregnant Female Rhesus Monkeys. *Cell* 173:1111-1122.e10.
- Marufu TC, Ahankari A, Coleman T and Lewis S (2015) Maternal smoking and the risk of still birth: systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 15:239.

- Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L and Gerdts V (2012) The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol* 20:50-7.
- Mohr EL, Block LN, Newman CM, Stewart LM, Koenig M, Semler M, Breitbach ME, Teixeira LBC, Zeng X, Weiler AM *et al.* (2018) Ocular and uteroplacental pathology in a macaque pregnancy with congenital Zika virus infection. *PLoS One* 13:e0190617.
- Moore KL, Persaud TVN and Torchia MG (2019) *The developing human: clinically oriented embryology*. 11th edition. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 522 pp.
- Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A and Cao-Lormeau VM (2015) Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* 21:359-61.
- Nazerai L, Pravsgaard Christensen J and Randrup Thomsen A (2019) A 'Furry-Tale' of Zika Virus Infection: What Have We Learned from Animal Models? *Viruses* 11:29.
- Nayak RB and Murthy P (2008) Fetal alcohol spectrum disorder. *Indian Pediatr* 45:977–983.
- Netto EM, Moreira-Soto A, Pedroso C, Höser C, Funk S, Kucharski AJ, Rockstroh A, Kümmerer BM, Sampaio GS, Luz E *et al.* (2017) Drexler JF. High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the Potential for Further Outbreaks. *mBio* 8:e01390-17.
- Norman JE and Reynolds RM (2011) The consequences of obesity and excess weight gain in pregnancy. *Proc Nutr Soc* 70:450-6.
- Oei JL (2020) Alcohol use in pregnancy and its impact on the mother and child. *Addiction* 115:2148-2163.
- Opaleye ES, Coelho HL, Schüler-Faccini L, de Almeida PC, dos Santos EC, Ribeiro AJ and Costa Fda S (2010) Avaliação de riscos teratogênicos em gestações expostas ao misoprostol [Evaluation of the teratogenic risks in gestations exposed to misoprostol]. *Rev Bras Ginecol Obstet* 32:19-35.
- Ornoy A (2009) Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol* 28:1-10.

Pastuszak AL, Schüler L, Speck-Martins CE, Coelho KE, Cordello SM, Vargas F, Brunoni D, Schwarz IV, Larrandaburu M, Safattle H *et al.* (1998) Use of misoprostol during pregnancy and Möbius' syndrome in infants. *N Engl J Med* 338:1881-5.

Pena LJ, Miranda Guarines K, Duarte Silva AJ, Sales Leal LR, Mendes Félix D, Silva A, de Oliveira SA, Junqueira Ayres CF, Júnior AS and de Freitas AC (2018) In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. *J Gen Virol* 99:1529-1550.

Plourde AR and Bloch EM (2016) A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis* 22:1185-92.

Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C, Ogden SC, Hammack C, Yao B, Hamersky GR, Jacob F, Zhong C *et al.* (2016) Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* 165:1238-1254.

Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA and Petersen LR (2016) Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med* 374:1981-7.

Rathore APS, Saron WAA, Lim T, Jahan N and St John AL (2019) Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus-induced microcephaly in fetuses. *Sci Adv* 5:eaav3208.

Rayner JO, Kalkeri R, Goebel S, Cai Z, Green B, Lin S, Snyder B, Hagelin K, Walters KB *et al.* (2018) Comparative Pathogenesis of Asian and African-Lineage Zika Virus in Indian Rhesus Macaque's and Development of a Non-Human Primate Model Suitable for the Evaluation of New Drugs and Vaccines. *Viruses* 10:229.

Reinhold JM, Lazzari CR and Lahondère C (2018) Effects of the Environmental Temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes: A Review. *Insects* 9:158.

Russell WMS and Burch RL (1959) The principles of humane experimental technique. http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc (11 de Junho de 2021).

Santos CNO, Ribeiro DR, Cardoso Alves J, Cazzaniga RA, Magalhães LS, de Souza MSF, Fonseca ABL, Bispo AJB, Porto RLS, Santos CAD *et al.* (2019) Association Between Zika Virus Microcephaly in Newborns With the rs3775291 Variant in Toll-Like Receptor 3 and rs1799964 Variant at Tumor Necrosis Factor- α Gene. *J Infect Dis* 220:1797-1801.

Schuler-Faccini L, Sanseverino M, Vianna F, da Silva AA, Larrandaburu M, Marcolongo-Pereira C and Abeche AM (2016a) Zika virus: A new human teratogen? Implications for women of reproductive age. *Clin Pharmacol Ther* 100:28-30.

Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, Doriqui MJ, Neri JI, Neto JM, Wanderley HY *et al.* (2016b) Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65:59-62.

Shao Q, Herrlinger S, Yang SL, Lai F, Moore JM, Brindley MA and Chen JF (2016) Zika virus infection disrupts neurovascular development and results in postnatal microcephaly with brain damage. *Development* 143:4127-4136.

Shepard TH (1994) "Proof" of human teratogenicity. *Teratology* 50:97-8.

Shi Y, Li S, Wu Q, Sun L, Zhang J, Pan N, Wang Q, Bi Y, An J, Lu X *et al.* (2018) Vertical Transmission of the Zika Virus Causes Neurological Disorders in Mouse Offspring. *Sci Rep* 8:3541.

Smith SM (2008) The avian embryo in fetal alcohol research. *Methods Mol Biol* 447:75-84.

Smithells RW and Newman CG (1992) Recognition of thalidomide defects. *J Med Genet* 29:716-23.

Souza BS, Sampaio GL, Pereira CS, Campos GS, Sardi SI, Freitas LA, Figueira CP, Paredes BD, Nonaka CK, Azevedo CM *et al.* (2016) Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Sci Rep* 6:39775.

Stern CD (2004) The chick embryo--past, present and future as a model system in developmental biology. *Mech Dev* 121:1011-3.

Stern C (2018) The chick model system: a distinguished past and a great future. *Int J Dev Biol* 62:1-4.

Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, Yao B, Shin J, Zhang F, Lee EM *et al.* (2016) Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* 18:587-90.

Taylor RM (1952) Studies on certain viruses isolated in the tropics of Africa and South America; their growth and behavior in the embryonated hen egg. *J Immunol* 68:473-94.

Thawani A, Sirohi D, Kuhn RJ and Fekete DM (2018) Zika Virus Can Strongly Infect and Disrupt Secondary Organizers in the Ventricular Zone of the Embryonic Chicken Brain. *Cell Rep* 23:692-700.

Thawani A, Sammudin NH, Reygaerts HS, Wozniak AN, Munnamalai V, Kuhn RJ and Fekete DM (2020) Zika virus can directly infect and damage the auditory and vestibular components of the embryonic chicken inner ear. *Dev Dyn* 249:867-883.

Therapontos C, Erskine L, Gardner ER, Figg WD and Vargesson N (2009) Thalidomide induces limb defects by preventing angiogenic outgrowth during early limb formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8573-8.

Tickle C, Summerbell D and Wolpert L (1975) Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature* 254:199–202.

Towers M and Tickle C (2009) Growing models of vertebrate limb development. *Development* 136:179-90.

Udenze D, Trus I, Berube N, Gerdtts V and Karniychuk U (2019) The African strain of Zika virus causes more severe *in utero* infection than Asian strain in a porcine fetal transmission model. *Emerg Microbes Infect* 8:1098-1107.

Vargas FR, Schuler-Faccini L, Brunoni D, Kim C, Meloni VF, Sugayama SM, Albano L, Llerena JC Jr, Almeida JC, Duarte A *et al.* (2000) Prenatal exposure to misoprostol and vascular disruption defects: a case-control study. *Am J Med Genet* 95:302-6.

Vergara MN and Canto-Soler MV (2012) Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. *Neural Dev* 7:22.

Vargesson N, Clarke JD, Vincent K, Coles C, Wolpert L and Tickle C (1997) Cell fate in the chick limb bud and relationship to gene expression. *Development* 124:1909-18.

Vargesson N (2009) Thalidomide-induced limb defects: resolving a 50-year-old puzzle. *Bioessays* 31:1327-36.

Vargesson, N (2013) Thalidomide Embryopathy: An Enigmatic Challenge. *ISRN Developmental* 241016.

- Vargesson N (2015) Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. *Birth Defects Res C Embryo Today* 105:140-56.
- Vargesson N (2019) The teratogenic effects of thalidomide on limbs. *J Hand Surg Eur Vol* 44:88-95.
- Vargesson N and Fraga L (2017) Teratogenesis. *eLS* 1-7.
- Venturini L and Sparber SB (2001) Salicylate and cocaine: interactive toxicity during chicken mid-embryogenesis. *Free Radic Biol Med* 30:198-207.
- Vermillion MS, Lei J, Shabi Y, Baxter VK, Crilly NP, McLane M, Griffin DE, Pekosz A, Klein SL and Burd I (2017) Intrauterine Zika virus infection of pregnant immunocompetent mice models transplacental transmission and adverse perinatal outcomes. *Nat Commun* 8:14575.
- Viale L, Allotey J, Cheong-See F, Arroyo-Manzano D, Mccorry D, Bagary M, Mignini L, Khan KS, Zamora J and Thangaratnam S (2015) Epilepsy in pregnancy and reproductive outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 386:1845-52.
- Vianna FS, Schüler-Faccini L, Leite JC, de Sousa SH, da Costa LM, Dias MF, Morelo EF, Doriqui MJ, Maximino CM and Sanseverino MT (2013) Recognition of the phenotype of thalidomide embryopathy in countries endemic for leprosy: new cases and review of the main dysmorphological findings. *Clin Dysmorphol* 22:59-63.
- Wallis JW, Aerts J, Groenen MA, Crooijmans RP, Layman D, Graves TA, Scheer DE, Kremitzki C, Fedele MJ, Mudd NK *et al.* (2004) A physical map of the chicken genome. *Nature* 432:761-4.
- Warkany J and Schrafenberger E (1946) Congenital malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency: I. Defects of the Eye. *Arch Ophthalmol* 35:150-169.
- Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G *et al.* (2016) Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res* 130:69-80.
- Wichgers Schreur PJ, van Keulen L, Anjema D, Kant J and Kortekaas J (2018) Microencephaly in fetal piglets following in utero inoculation of Zika virus. *Emerg Microbes Infect* 7:42.

Wiens DJ, Mann TK, Feddersen DE, Rathmell WK and Franck BH (1992) Early heart development in the chick embryo: effects of isotretinoin on cell proliferation, alpha-actin synthesis, and development of contractions. *Differentiation* 51:105-12.

Williams RM, Senanayake U, Artibani M, Taylor G, Wells D, Ahmed AA and Sauka-Spengler T (2018) Genome and epigenome engineering CRISPR toolkit for in vivo modulation of cis-regulatory interactions and gene expression in the chicken embryo. *Development* 145:dev160333.

Willard KA, Demakovsky L, Tesla B, Goodfellow FT, Stice SL, Murdock CC and Brindley MA (2017) Zika Virus Exhibits Lineage-Specific Phenotypes in Cell Culture, in *Aedes aegypti* Mosquitoes, and in an Embryo Model. *Viruses* 9:383.

Wilson JG (1973) *Environment and Birth Defects (Environmental Science Series)*. New York and London: Academic Press.

World Health Organization. Congenital anomalies (2020a), <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/congenital-anomalies> (11 de Junho de 2021).

World Health Organization. Distribution of causes of death among children aged < 5 years (%) (2020b), [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/distribution-of-causes-of-death-among-children-aged-5-years-\(-\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/distribution-of-causes-of-death-among-children-aged-5-years-(-)) (11 de Junho de 2021).

Wu KY, Zuo GL, Li XF, Ye Q, Deng YQ, Huang XY, Cao WC, Qin CF and Luo ZG (2016) Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. *Cell Res* 26:645-54.

Xavier-Neto J, Carvalho M, Pascoalino BD, Cardoso AC, Costa ÂM, Pereira AH, Santos LN, Saito Â, Marques RE, Smetana JH *et al.* (2017) Hydrocephalus and arthrogryposis in an immunocompetent mouse model of ZIKA teratogeny: A developmental study. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0005363.

Xu D, Li C, Qin CF and Xu Z (2019) Update on the Animal Models and Underlying Mechanisms for ZIKV-Induced Microcephaly. *Annu Rev Virol* 6:459-479.

Yamamoto FY, Filipak Neto F, Freitas PF, Oliveira Ribeiro CA and Ortolani-Machado CF (2012) Cadmium effects on early development of chick embryos. *Environ Toxicol Pharmacol* 34:548-555.

Yazigi A, De Pecoulas AE, Vauloup-Fellous C, Grangeot-Keros L, Ayoubi JM and Picone O (2017) Fetal and neonatal abnormalities due to congenital rubella syndrome: a review of literature. *J Matern Fetal Neonatal Med* 30:274-278.

Yockey LJ, Jurado KA, Arora N, Millet A, Rakib T, Milano KM, Hastings AK, Fikrig E, Kong Y, Horvath TL *et al.* (2018) Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Sci Immunol* 3:eaao1680.

Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN and Luz K (2015) First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110: 569–572.

ANEXO

Molecular mechanisms of Zika virus teratogenesis from animal studies: a systematic review protocol


Wachholz GE, do Amaral Gomes J, Boquett JA, Vianna FSL, Schuler-Faccini L and Fraga LR (2021) Molecular mechanisms of Zika virus teratogenesis from animal studies: a systematic review protocol. Syst Rev 10:160.

PROTOCOL

Open Access

Molecular mechanisms of Zika virus teratogenesis from animal studies: a systematic review protocol



Gabriela Elis Wachholz^{1,2,3†}, Julia do Amaral Gomes^{1,2,3†}, Juliano André Boquett^{1,4}, Fernanda Sales Luiz Vianna^{1,2,3,5}, Lavínia Schuler-Faccini^{1,2,4} and Lucas Rosa Fraga^{2,3,5,6*} 

Abstract

Background: Due to the diversity of studies in animal models reporting that molecular mechanisms are involved in the teratogenic effect of the Zika virus (ZIKV), the objective of the present study is to evaluate the methodological quality of these studies, as well as to demonstrate which genes and which molecular pathways are affected by ZIKV in different animal models.

Methods: This search will be performed in four databases: PubMed/MEDLINE, EMBASE, Web of Science, and Scopus, as well as in the grey literature. The studies selection process will be reported through the *PRISMA Statement* diagram model. All studies describing the molecular mechanisms possibly involved in the development of malformations caused by embryonic/fetal ZIKV exposure in animal models with an appropriate control group and methodology will be included (including, for instance, randomized and non-randomized studies). All animals used as experimental models for ZIKV teratogenesis may be included as long as exposure to the virus occurred during the embryonic/fetal period. From the selected studies, data will be extracted using a previously prepared standard form. Bias risk evaluation will be conducted following the *SYRCLE's* Risk of Bias tool. All data obtained will be tabulated and organized by outcomes (morphological and molecular).

Discussion: With the proposed systematic review, we expect to present results about the methodological quality of the published studies with animal models that investigated the molecular mechanisms involved in the teratogenic effect of ZIKV, as well as to show the studies with greater reliability.

Systematic review registration: PROSPERO [CRD42019157316](https://www.crd42019157316)

Keywords: Gene expression, Epigenetics, Experimental models, Microcephaly, CNS birth defects, Infection

* Correspondence: lfraga@ufrgs.br

[†]Gabriela Elis Wachholz and Julia do Amaral Gomes contributed equally to this work.

²Teratology Information Service, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-903, Brazil

³Laboratory of Genomic Medicine, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-903, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Zika virus (ZIKV) was first isolated from rhesus monkeys in the Zika Forest (Uganda) in 1947, and the first cases of human infection were reported in Nigeria in 1954 [6, 12]. In 2015, a large increase of newborns with microcephaly was reported in Brazil [13], and it is already consolidated by the literature that this increase was due to the exposure to ZIKV infection during pregnancy [13, 18, 19].

The most concerning effects of ZIKV infection are related to pregnancy, when its infection can lead to a set of abnormalities related to impaired Central Nervous System development of the embryo/fetus. The phenotype spectrum ranges from absent/mild/moderate microcephaly without distinctive dysmorphic features to a severe microcephaly, and also can include contractures, ranging from dimples to generalized arthrogryposis [5]. Such abnormalities comprise the Congenital ZIKV Syndrome (CZS) [4, 5].

Several experimental studies have presented results that not only confirm ZIKV as the causative agent of the observed congenital anomalies, but also suggest possible molecular mechanisms by which the virus leads to adverse outcomes. These animal studies include non-human primates, chicken embryos, hamsters, guinea pigs, and swine [3, 10, 14, 17, 23, 24], using different approaches to analyze the mechanisms of infection and teratogenesis of ZIKV. Such results are related to ZIKV changes in gene expression in genes involved in autophagy and apoptosis processes in mouse embryos' brains [2] as well as cell cycle and immune response [11].

Little is known about how ZIKV can actually produce the visualized changes in affected babies. In vivo studies have pointed out the different pathways and genes or proteins that are involved in this process; however, there are few literature reviews on this field and no systematic reviews. Thus, to compile, the results from experimental models are important not only to understand the molecular mechanism of the syndrome, but also to propose hypotheses, prevention strategies, and possible treatment to the damage caused by the virus.

Objective

The objective of this systematic review is to assess the methodological quality of the studies in animal models that investigated the molecular mechanisms of ZIKV teratogenesis. Through a systematic search in literature databases and proper data extraction and analyses, in addition to the evaluation of the methodological quality of the studies, we aim to present the genes and molecular pathways which were shown to be affected by ZIKV in different animals.

Methods/design

Study question

This systematic review protocol has the following research question: what are the molecular mechanisms

involved in the teratogenesis of the Zika virus proposed in studies with animal models?

Protocol and registration

This protocol was developed by the members of the Reproductive and Developmental Biology Laboratory at Universidade Federal do Rio Grande do Sul. These members are biologists and physicians specializing in clinical, molecular and experimental teratogenesis. This protocol was written in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis Protocols (PRISMA-P) guideline [15, 20]. In addition, the protocol has been registered with the International Prospective Registry of Systematic Reviews (PROSPERO) under registration ID CRD42019157316 (https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42019157316).

Eligibility criteria

From the question proposed in this protocol, the study's Population, Intervention, Comparison, and Outcome (PICO) was established, as well as its resulting concepts:

Population

The *population/species* studied will be animal models with Congenital Zika Syndrome, including all species already studied in all different types of biomedical and biological experimental studies regardless of gender or species.

Intervention

The *intervention/exposure* will be the exposure to ZIKV during the embryonic/fetal period of development in any method of exposure, in any viral amount/titration, and at any stage of the embryo/fetal development.

Comparison

The *control population* will be given by a group of animals in the same study which undergone the same conditions of the treated/exposed animals but without ZIKV or other virus exposures.

Outcome

Two *outcomes* will be assessed. A primary outcome is that the studies must be analyzing the occurrence of congenital anomalies in the ZIKV-treated animals, where at least one morphological parameter (anatomical, histological, etc.) proves such effects. A secondary outcome is that all studies must have analyzed the presence or absence of molecular changes caused by such exposure that may be correlated to the observed anomalies. These molecular parameters include gene expression, proteomics, methylation patterns, or any other approach that investigates the possible changes in the patterns,

structure, or amount of cellular macromolecules (DNA, RNA and proteins).

Search strategy

A literature search to find relevant studies will be performed in four databases: PubMed/MEDLINE, EMBASE, Web of Science and Scopus, as well as in the grey literature, through the following sources: bioRxiv, OpenGrey, and PQDT Open. The databases present publications from medical, biomedical, pharmacological and life sciences journal literature. Before starting this protocol, searches were performed in order to identify any existing systematic review of molecular mechanisms of ZIKV from animal studies.

A combination of controlled vocabulary terms [e.g., Medical Subject Headings (MeSH)] and free-text terms will be used in the searches. For instance, in PubMed/MEDLINE search for ZIKV, the following will be used: Zika Virus[mh] OR Zika Virus Infection[mh] OR NS1 protein, zika virus[nm] OR Zika[tiab] OR ZikV[tiab]. Drafts for the search strategies for all the four databases that will be used for the systematic review are provided in Supplementary Table 1. This list was developed by all

the members of the research group after consulting a librarian with extensive experience in setting up search strategies for systematic reviews of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. No language restrictions or publication date will be applied.

Study selection

Abstracts, conference papers, erratum, letters to the editor, and short survey will be considered for the systematic review. Review articles; editorials; case reports; studies with humans or human samples; studies exclusively ex vivo, in vitro, or in silico; studies in which methodological information is absent or unclear; and studies that have no relevance to the research question will be excluded. In addition, vaccine development studies will also be excluded. Studies in which the exposure to ZIKV has occurred in the postnatal period will not be considered.

The process from searching for studies to the final selection of studies that will compose the systematic review is shown in Fig. 1. The selection of the relevant studies will be performed in two phases. In the first phase, two independent reviewers will screen by reading

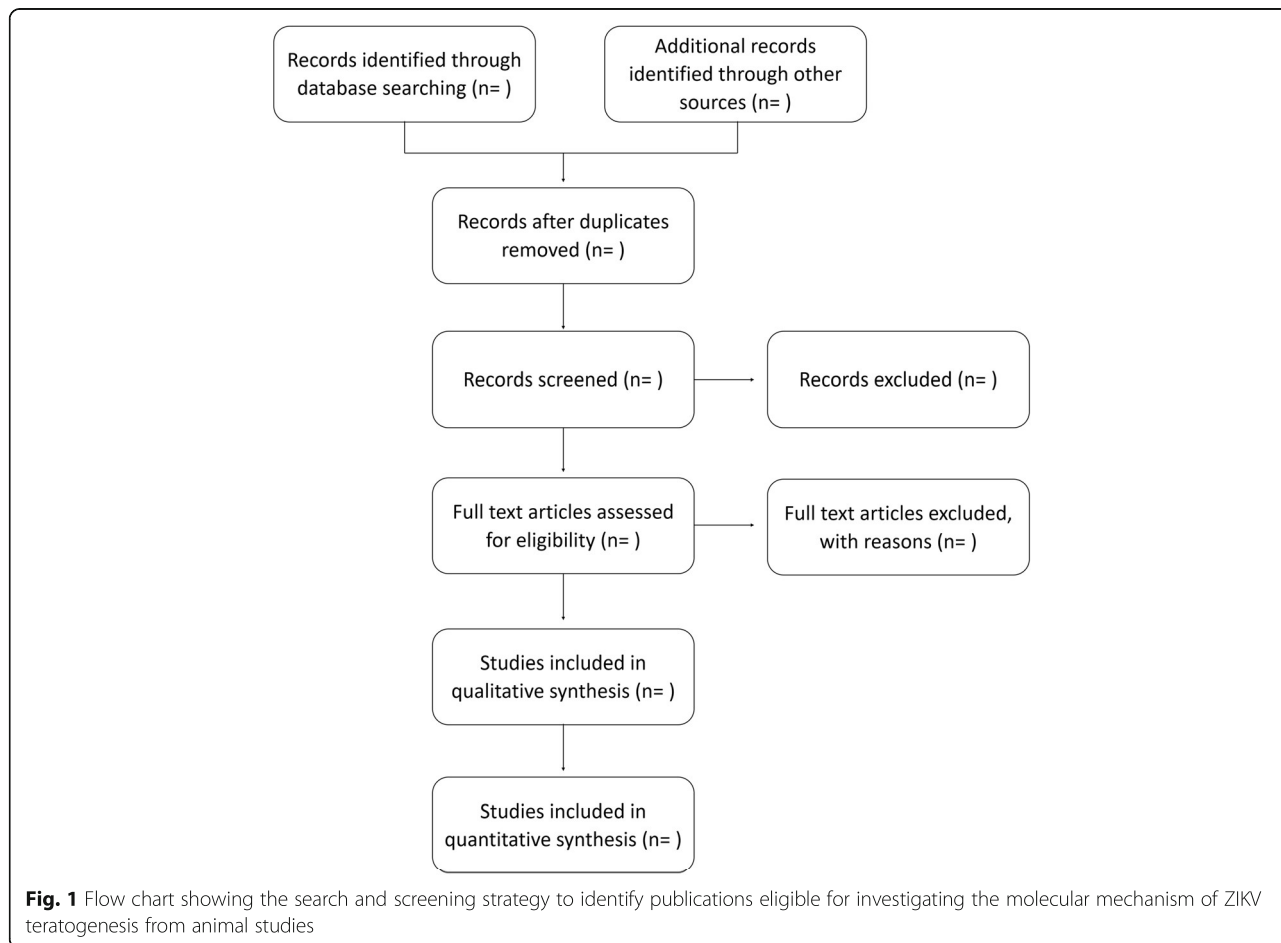


Fig. 1 Flow chart showing the search and screening strategy to identify publications eligible for investigating the molecular mechanism of ZIKV teratogenesis from animal studies

the titles and abstracts of the articles. In the second phase, full texts of the articles selected in the first phase will undergo an evaluation. The study selection process will be reported through the *PRISMA Statement* diagram model (Fig. 1) [15, 20]. Two reviewers will screen all the titles, abstracts, and full texts for potential eligibility in an independent manner. Disagreements between reviewers will be resolved either by consensus or by consulting a third reviewer. In addition, the evaluation of agreement between reviewers will be tested by using Cohen's kappa coefficient test [1].

A pilot search using the designed search strategies (Supplementary Table 1) was carried out on August 17, 2020, in which 1481 records were obtained (634 from PubMed, 674 from EMBASE, and 173 records from other sources). After the removal of duplicates ($n = 177$), 1304 unique studies were eligible for the title and abstract screening. From this first screening, 38 publications were selected for full-text screening and seven were finally selected for data extraction. Therefore, we expect to include around 10–15 studies in the final systematic review.

Data extraction

General characteristics of the included articles

The data processing will be performed according to the diagram presented in Fig. 2. The design and methodological characteristics of each study will be extracted (Supplementary Table 2), such characteristics include type of study, sample size of each experimental group, experimental design (e.g., sample size calculation), experimental groups, animal housing, period of follow-up, age of development in which animals were inoculated, methods and techniques used for outcome assessment, and use of guidelines to conduct and publish the study (e.g., ARRIVE Statement) [9]. Information of animal models will also be extracted, including species used, lineage, age, and genetic modification factors.

Intervention characteristics

The method of ZIKV applications can be different among species; in some species, the teratogenic agent is applied directly onto the embryo (e.g., chicken embryos); in others, the application is applied indirectly through application to the mother (e.g., rodents and non-human primates). Therefore, the methods of viral application/embryonic exposure to ZIKV will also be extracted in detail in order to compare the different studies (Supplementary Table 2). Moreover, the amount of virus applied (volume and viral load) and the route of viral inoculation will also be extracted. Finally, the period in which animals have been exposed to ZIKV (post-inoculation time) will also be assessed individually.

Outcome measures

Information regarding outcome data, their units, and types will be collected according to the following outcomes:

1. Teratogenic analyses data: number and percentage of animals with congenital anomalies, descriptive summary of such anomalies, and description of organs (e.g., head and eyes) that showed differences in morphological measurements between ZIKV-exposed and controls. Since some studies have shown variability between the confirmation of infection in the mothers and the embryos/fetuses (using qPCR data), the number of animals with positive results to ZIKV infection will also be collected.
2. Molecular analyses data: the absence or presence, as well as the measurements, of altered gene expression, protein expression, epigenetic characteristics of the location of a given protein in a cell considering the experimental groups (case or controls). In addition to these descriptive data, information related to histological and cellular data will be collected. Molecular data will have their descriptive data collected (increase, decrease, or absence of variation) as well as continuous data (increase or reduction ratio, or absence of variation).

These data will be extracted from both the original articles and [supplementary materials](#), when available or even will be requested to the authors.

Initially, data extraction will be performed by obtaining numerical and descriptive values directly from the tables, figures, and information of the results section of each study. When only percentages are presented, the values will be calculated based on the sample size information. Finally, if it is not possible to obtain relevant data, the authors will be contacted.

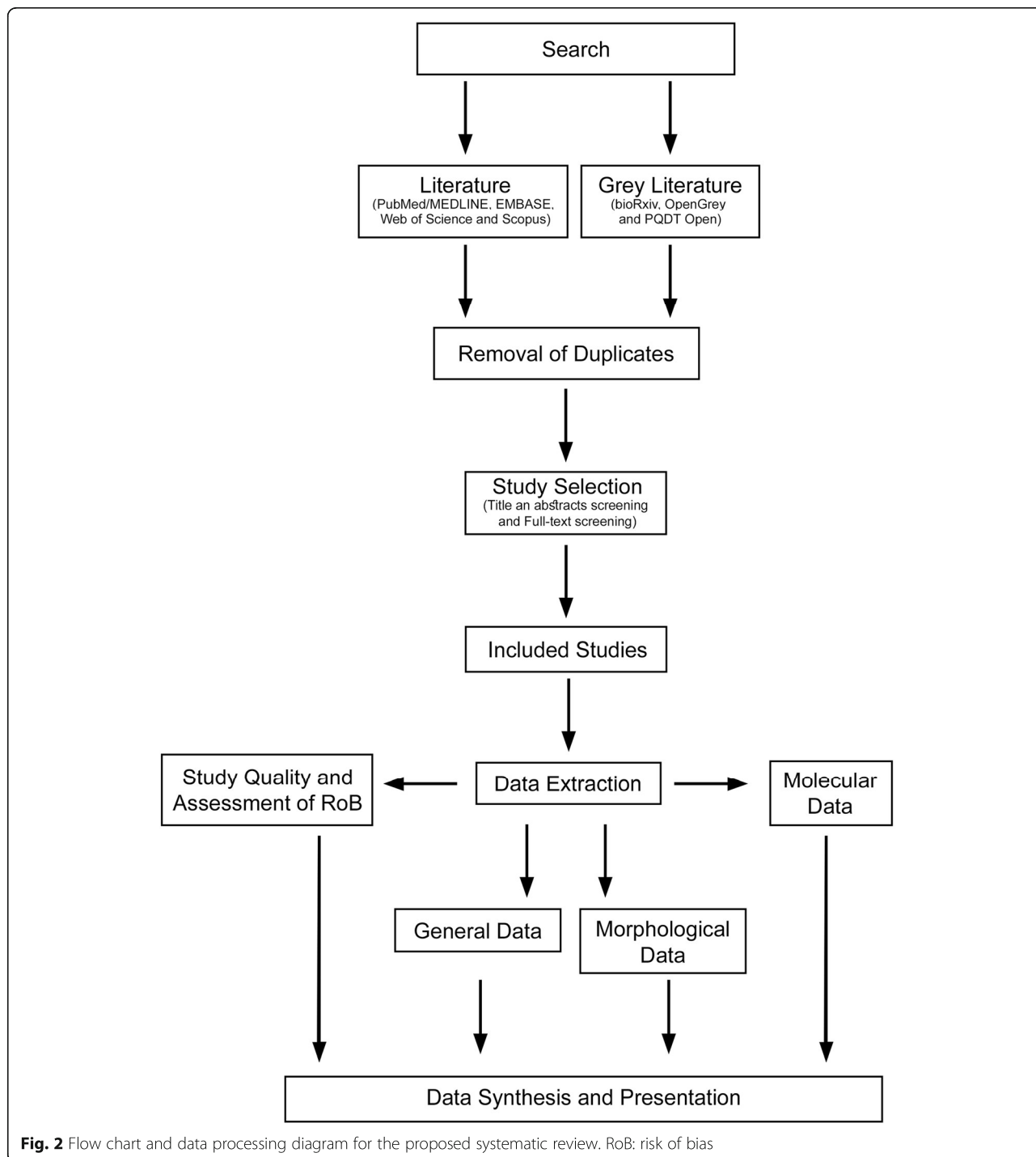
In cases where two research sources are potentially describing the same data, the study with a larger dataset and/or more complete reporting of the results will be included. Data collection will be conducted by one reviewer and checked by a second. Cases of disagreement will be resolved by consensus or by consultation of a third reviewer.

Others parameters

The number of deaths, dropouts (animals that have been removed from the study during the experiments), reason for exclusion, and incomplete experiments will be extracted.

Assessment of risk of bias and study quality

Risk of bias and analysis of the quality of the studies will be carried out independently by two reviewers of this



study. Disagreement between the review authors will be solved by including a third reviewer.

The risk of bias will be performed using the Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation (SYRCLE) Risk of Bias tool developed by SYRCLE to assess animal intervention studies [8]. This tool includes domains of selection bias, driving,

detection, friction, and reporting of results. The risk of bias from each study will be reported as low, unclear, and high. In addition to these types of biases evaluated, we will include in the analysis peer-reviewed publication, report on sample size calculation, and report on the use of guidelines for the execution and publication of the studies.

Data synthesis

From the pilot searches, it was possible to observe that there is a high variability on the selected studies concerning the methods of molecular evaluation (RNAseq, qPCR, and so on), gestational period of intervention, species evaluated, etc. Therefore, a meta-analysis involving studies with such different characteristics is unlikely ever to be feasible. Therefore, data synthesis will be performed in a narrative manner, as follows.

All data obtained will be tabulated and organized by outcomes (morphological and molecular) in order to allow further analysis. The studies will also be grouped according to the used animal species for the *in vivo* assays, and, within the species groups, they will be differentiated in lineages and ages of embryonic/fetal development (by intervals) as well as the evaluated organs in which the molecular analyses (RT-qPCR or RNA sequencing, for example) were performed.

Morphological data will be combined and compared in a descriptive manner according to the different studies, since the focus of this review is on molecular alterations and all included studies will be those that determine structural malformations (congenital anomalies) in exposed embryos. For molecular data, a list of genes/proteins with altered expression or altered epigenetic patterns will be created according to the abovementioned grouping method. Considering that the method of evaluating these changes may have been conducted with different tools and equipment, when possible, the data will be pooled together aiming to find the most frequently affected genes/proteins. All data will be extracted from groups exposed to ZIKV and controls, and genes will be evaluated individually. Genes and proteins will be compared and ranked according to the fold change values.

The studies/data showing morphological and molecular alterations caused by ZIKV exposure during embryonic development will be prioritized for summary and synthesis. Extracted data will be first presented narratively in tables (morphological and molecular data tables) and then, whether possible, through Venn diagrams and illustrations showing common genes/proteins affected by the viral exposure.

The limitations of the data synthesis of the selected studies are related to the fact that the research question of this systematic review can generate diversified studies. For instance, the studies can utilize different animal species and different molecular analysis techniques, making their combination difficult.

Availability of data

The complete list of studies will be made available as [supplementary material](#), and raw data will be made

available from the corresponding author on reasonable request.

Discussion

We are conducting the first systematic review of possible molecular mechanisms involved in CZS in animal models. Nowadays, there are many studies comprising ZIKV teratogenic capacities utilizing different animal models as mice, rats, porcine, marmoset, chicken, and non-human primates [2, 3, 7, 16, 17, 21, 22, 24]. Such animal models are mainly used due to rodents being very common to biomedical research or, in case of non-human primates, due to their similarity to humans.

By compiling and comparing the data, the methodological quality of different studies on animal models will be presented. From our systematic review, other studies analyzing data in which no congenital defect was found in animals exposed to ZIKV infection during development would be interesting and helpful in explaining how slight molecular changes could explain a threshold for congenital anomalies. In this context, our results will certainly be of great relevance for future studies in this area, allowing the extrapolation of our findings in research with hypotheses directed to humans or even animal models.

Abbreviations

SYRCL: Center for Systematic Review for Laboratory Animal Experimentation; CZS: Congenital ZIKV Syndrome; ZIKV: Zika virus; PICO: Population, Intervention, Comparison, and Outcome

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01713-6>.

Additional File 1: Table S1. Draft Search Strategy. **Table S2.** List of data to be extracted from the studies included in the systematic review.

Acknowledgements

The authors thank the librarian Viviane Carrion Castanho from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul for the technical assistance in setting the list of search terms.

Authors' contributions

GEW, JAG, JAB, and LRF wrote and reviewed the manuscript. JAG and LRF contributed to the conception of the study. The search strategy was developed by all the authors and will be performed by GEW and JAG. GEW, JAG, JAB, and LRF will independently screen the potential studies, extract data from the included studies, assess the risk of bias, and complete the data synthesis. All authors approved the publication of the protocol. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

LRF lab funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant number 424362/2018-0], Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) [grant number 2019-0649] and PROPESQ/UFRGS through "Recently Hired Professors" [Call 001/2019]. FSLV is recipient of a CNPq scholarship grant [grant number CNPq 312993/2017-0].

Availability of data and materials

The protocol of this systematic review will be available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations**Ethics approval and consent to participate**

The data analyzed in this review neither will include patient data nor execute animal intervention approaches; therefore, ethical approval is not required. Nevertheless, this project is registered and approved along with the Research and Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, an institution in which all authors are affiliated (n° CAAE 23337119.6.0000.5327).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Department of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil. ²Teratology Information Service, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-903, Brazil. ³Laboratory of Genomic Medicine, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-903, Brazil. ⁴Graduate Program in Child and Adolescent Health, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. ⁵Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90035-003, Brazil. ⁶Department of Morphological Sciences, Institute Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

Received: 9 December 2019 Accepted: 18 May 2021

Published online: 29 May 2021

References

- Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas.* 1960;20(1):37–46. <https://doi.org/10.1177/00131646002000104>.
- Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 2016;534(7606):267–71. <https://doi.org/10.1038/nature18296>.
- Darbellay J, Cox B, Lai K, Delgado-Ortega M, Wheler C, Wilson D, et al. Zika virus causes persistent infection in porcine conceptuses and may impair health in offspring. *E Bio Medicine.* 2017;25:73–86.
- de Araújo TVB, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, de Barros M-FD, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(12):1356–63. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30318-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30318-8).
- Del Campo M, Feitosa IML, Ribeiro EM, Horovitz DD, Pessoa AL, França GV, et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. *Am J Med Genet Part A.* 2017;173(4):841–57. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38170>.
- Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46:509e520.
- Gorman MJ, Caine EA, Zaitsev K, Begley MC, Weger-Lucarelli J, Uccellini MB, et al. An immunocompetent mouse model of Zika virus infection. *Cell Host Microbe.* 2018;23(5):672–85 e6.
- Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCL's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol.* 2014;26:14–43.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8(6):e1000412.
- Kumar M, Krause KK, Azouz F, Nakano E, Nerurkar VR. A guinea pig model of Zika virus infection. *Virology.* 2017;14(1):75. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0750-4>.
- Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell.* 2016;19(1):120–6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.017>.
- Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1954;48:139e145.
- Marrs C, Olson G, Saade G, Hankins G, Wen T, Patel J, et al. Zika virus and pregnancy: a review of the literature and clinical considerations. *Am J Perinatol.* 2016;33(7):625–39. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1580089>.
- Martinot AJ, Abbink P, Afacan O, Prohl AK, Bronson R, Hecht JL, et al. Fetal neuropathology in Zika virus-infected pregnant female rhesus monkeys. *Cell.* 2018;173(5):1111–22 e10.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: the PRISMA Statement. *PLoS Med.* 2009;6(7):e1000097. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>.
- Nazeri L, Christensen JP, Thomsen AR. A 'furry-tale' of Zika virus infection: what have we learned from animal models? *Viruses.* 2019;11(1):29. <https://doi.org/10.3390/v11010029>.
- Pena LJ, Guarines KM, Silva AJD, Leal LRS, Félix DM, Silva A, et al. In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. *J Gen Virol.* 2018;99(12):1529–50. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001153>.
- Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika virus and birth defects - reviewing the evidence for causality. *N Engl J Med.* 2016;374(20):1981–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMsr1604338>.
- Schuler-Faccini L, Sanseverino M, Vianna F, da Silva AA, Larrandaburu M, Marcolongo-Pereira C, et al. Zika virus: a new human teratogen? Implications for women reproductive age. *Clin Pharmacol Ther.* 2016;100(1):28–30. <https://doi.org/10.1002/cpt.386>.
- Shamseer L, Moher D, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols (PRISMA-P) 2015: elaboration and explanation. *BMJ.* 2015;349:1–25.
- Seferovic M, Sánchez-San Martín C, Tardif SD, Rutherford J, Castro ECC, Li T, et al. Experimental Zika virus infection in the pregnant common marmoset induces spontaneous fetal loss and neurodevelopmental abnormalities [published correction appears in *Sci Rep* 8(1):16131]. *Sci Rep.* 2018;8(1):6851. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25205-1>.
- Sherer ML, Khanal P, Talham G, Brannick EM, Parcels MS, Schwarz JM. Zika virus infection of pregnant rats and associated neurological consequences in the offspring. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218539>.
- Siddharthan V, van Wettere AJ, Li R, Miao J, Wang Z, Morrey JD, et al. Zika virus infection of adult and fetal STAT2 knock-out hamsters. *Virology.* 2017;507:89–95. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.04.013>.
- Thawani A, Sirohi D, Kuhn RJ, Fekete DM. Zika virus can strongly infect and disrupt secondary organizers in the ventricular zone of the embryonic chicken brain. *Cell Rep.* 2018;23(3):692–700. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.080>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

