

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA**

Fernanda Marques da Silva

**ANÁLISE DA INFECÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* PELO ZIKA VÍRUS NO
DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES**

Porto Alegre

2022

Fernanda Marques da Silva

**ANÁLISE DA INFECÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* PELO ZIKA VÍRUS NO
DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves.

Coorientadora: Prof. Dra. Patrícia Sesterheim.

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

da Silva, Fernanda Marques
Análise da infecção in vitro e in vivo pelo Zika
vírus no desenvolvimento de doenças cardiovasculares /
Fernanda Marques da Silva. -- 2022.
73 f.
Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves.

Coorientadora: Patrícia Sesterheim.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Zika vírus. 2. Doenças cardiovasculares. 3.
Animais imunocompetentes. I. Gonçalves, Carlos Alberto
Saraiva, orient. II. Sesterheim, Patrícia, coorient.
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“A vida é uma união simbiótica e cooperativa que permite triunfar aqueles que se associam”

Lynn Margulis

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, os meus agradecimentos são para os animais utilizados neste estudo, sem eles nada disto seria possível.

A minha coorientadora, amiga, irmã e mãe científica Dra. Patrícia Sesterheim, quero agradecer do fundo do meu coração por ter enxergado a pesquisadora que eu poderia ser e por sempre me apoiar, independente da situação. Esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e mais lindos da minha vida, gratidão!

Ao meu orientador, Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves, também quero agradecer por ter acreditado neste projeto e em mim, por ter me aceitado no Lab. 33 onde fui muito bem recebida. Sou grata por todas as trocas de ideias e conversas, é sempre um grande aprendizado conversar contigo.

Aos meus pais, por sempre terem feito tudo que puderam para a realização dos meus sonhos, por me apoiarem em qualquer momento e por acreditarem na Bióloga que eu poderia me tornar.

Ao meu noivo Jean, agradeço por ter estado comigo nos piores e melhores momentos, do seu jeitinho sempre demonstrando que estaria do meu lado e lutaria qualquer batalha. Obrigada pela paciência e amor enquanto um turbilhão de coisas acontecia durante este mestrado.

Gostaria de agradecer a todos os funcionários do Centro de Cardiologia Experimental (CCE) com quem tive o privilégio de conviver e aos colaboradores desta dissertação, que com seus conhecimentos e expertises deixaram este trabalho mais rico. Aos meus parceiros de laboratório e vida, Rafael, Andrya, Thaís e Ana, grata por todas as conversas, risadas, lágrimas, parceria e amizade de sempre. Cada momento e conhecimento compartilhado foram importantes para eu me tornar a pesquisadora que sou hoje. Aos meus amigos, Elenise, Tailine e Thainê, obrigada por me ouvirem, apoiarem e por sempre se interessarem por tudo que faço.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Diogo por sempre ter acreditado no CCE e por todo apoio para a realização desta dissertação. Meus agradecimentos também a CAPES, CNPq e FINEP pelo apoio e financiamento.

SUMÁRIO

PARTE I	6
RESUMO.	7
ABSTRACT.	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Zika	12
1.2 Doenças Cardiovasculares e infecção pelo Zika vírus	15
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	21
PARTE II	22
4. ARTIGO	23
4.1 Avaliação da infecção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> pelo vírus Zika no desenvolvimento de doenças cardiovasculares	23
PARTE III	51
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	59
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	60
9. REFERÊNCIAS	61

PARTE I

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV) é conhecido por sua relação com complicações neurológicas, entretanto, estudos recentes também indicam que o ZIKV pode estar relacionado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Diante do aumento do número de relatos de casos de pacientes com complicações cardíacas após a infecção por ZIKV, se faz necessário estudos experimentais que busquem investigar esta associação. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da infecção pelo ZIKV, *in vitro*, *in vivo* e *in silico* no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No estudo *in vitro* células H9c2 e A7r5 foram infectadas com o ZIKV de origem brasileira, utilizando multiplicidade de infecção (MOI) de 1; 0,1 e 0,01. As células infectadas foram observadas diariamente em microscópio óptico para verificação de efeito citopático (ECP). A cada 24h pós-infecção, durante um período de 4 dias, os cultivos infectados foram congelados, descongelados e aliquotados para posterior análise de genoma viral por qPCR e titulação viral. Para análise da viabilidade celular foi realizado o teste de atividade da lactato desidrogenase (LDH) e para estresse oxidativo foi analisada a proteína carbonil e redução de NBT. No experimento *in vivo*, camundongos fêmeas FVB/N (n=8), com idade de 60 dias, foram inoculados com 1×10^5 UFP de ZIKV via intravenosa. Após 4 dias de infecção, foi realizada coleta de sangue e tecido cardíaco para análise de troponina T, atividade enzimática de fatores de coagulação, aminopeptidases e análise de estresse oxidativo. Foi realizada análise estatística univariada através do teste *t* e ANOVA. Ainda, correlacionamos genes listados na Zika Virus Infection Database (ZIKAVID) aos genes ligados ao estresse oxidativo da Mouse Genome Database (MGD) a fim de verificar associação entre doenças cardíacas, estresse oxidativo e o ZIKV. As linhagens celulares apresentaram ECP característico de infecção viral e o RNA genômico foi detectado em todos os períodos analisados. A linhagem H9c2 produziu uma quantidade de vírus significativamente superior à A7r5 e analisando o estresse oxidativo após infecção, verifica-se que os níveis médios de conteúdo carbonil foram significativamente maiores nas linhagens celulares infectadas. Já *in vivo*, nas fêmeas infectadas houve um aumento significativo de troponina T quando comparado ao grupo controle. Ainda, observou-se um aumento significativo da

atividade de enzimas fibrinolíticas e níveis elevados das aminopeptidases. Também, os resultados demonstraram alto índice de estresse oxidativo no tecido cardíaco de camundongos infectados. Conclui-se que além da suscetibilidade celular ao ZIKV, animais imunocompetentes infectados apresentam marcador de injúria celular elevado com ativação de enzimas pró-coagulantes e uma regulação negativa da fibrinólise, o que provavelmente indica um estado pró-trombótico nesses animais, evidenciando uma associação entre o vírus e complicações cardíacas

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is known for its relationship with neurological complications, however, recent studies also indicate that ZIKV may be related to the development of cardiovascular diseases. In view of the increasing number of case reports of patients with cardiac complications after ZIKV infection, experimental studies are needed to investigate this association. The aim of this study was to evaluate the effects of ZIKV infection, *in vitro*, *in vivo* and *in silico* on the development of cardiovascular diseases. In the *in vitro* study, H9c2 and A7r5 cells were infected with ZIKV of Brazilian origin, using a multiplicity of infection (MOI) of 1; 0.1 and 0.01. Infected cells were observed daily under an optical microscope to verify the cytopathic effect (CPE). Every 24h post-infection, during a period of 4 days, the infected cultures were frozen, thawed and aliquoted for subsequent analysis of the viral genome by qPCR and viral titration. For cell viability analysis, the lactate dehydrogenase (LDH) activity test was performed and for oxidative stress, carbonyl protein and NBT reduction were analyzed. In the *in vivo* experiment, female FVB/N mice (n=8), aged 60 days, were inoculated with 1×10^5 PFU of ZIKV intravenously. After 4 days of infection, blood and cardiac tissue were collected for analysis of troponin T, enzymatic activity of clotting factors, aminopeptidases, analysis of oxidative stress. Univariate statistical analysis was performed using the *t* test and ANOVA. Furthermore, we correlated genes listed in the Zika Virus Infection Database (ZIKAVID) with genes linked to oxidative stress from the Mouse Genome Database (MGD) in order to verify an association between heart disease, oxidative stress and ZIKV. The cell lines showed CPE characteristic of viral infection and genomic RNA was detected in all analyzed periods. The H9c2 cells produced a significantly higher amount of virus than A7r5 and analyzing the oxidative stress after infection, it appears that the average levels of carbonyl content were significantly higher in the infected cell lines. *In vivo*, in infected females, there was a significant increase in troponin T when compared to the control group. Furthermore, there was a significant increase in the activity of fibrinolytic enzymes and high levels of aminopeptidases. Also, the results showed a high rate of oxidative stress in the heart tissue of infected mice. It is concluded that in addition to cellular susceptibility to ZIKV, infected

immunocompetent animals have a high marker of cell injury with activation of procoagulant enzymes and a negative regulation of fibrinolysis, which probably indicates a prothrombotic state in these animals, evidencing an association between the virus and heart complications.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A7r5 – Células de músculo liso aórtico murino, do inglês *rat aortic vascular smooth muscle cells*

AKT – Proteína cinase B, do inglês *protein kinase B*

ANG – Angiotensina, do inglês *angiotensin*

AXL – Receptor tirosina cinase, do inglês *receptor tyrosine kinase*

BCA – Ácido biconônico, do inglês *bicinchoninic acid*

BSA – Soro albumina bovina, do inglês *bovine serum albumin*

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

CIBio – Comissão interna de biossegurança

CHO – Ovário de hamster chinês, do inglês *chinese hamster ovary cells*

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPK – Creatinofosfoquinase, do inglês *creatine phosphokinase*

CTRL – Controle

cTnT – Troponina T, do inglês *troponin T*

DENV – Vírus da Dengue, do inglês *Dengue viruses*

DCV – Doenças cardiovasculares

ECA – Enzima conversora de Angiotensina, do inglês *angiotensin-converting enzyme*

ECG – Eletrocardiograma

ECP – Efeito citopático

ERO – Espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

Fxa – Fator X ativado, do inglês *activated fator X*

GAS6 – Gene 6 específico para parada de crescimento, do inglês *growth arrest specific 6*

GPx - Glutathiona peroxidase, do inglês *glutathione peroxidase*

GSH – Glutathiona, do inglês *glutathione*

H9C2 – Células de mioblastos cardíacos embrionários de rato, do inglês *rat embryonic cardiac myoblast cells*

HacaT – Queratinócitos, do inglês *human epidermal keratinocytes*

HPI – Horas pós-infecção, do inglês *hours post-infection*

HUASMC – Células do músculo liso da artéria umbilical humana, do inglês *human umbilical artery smooth muscle cells*

Huh7.5 – Células hepáticas humanas, do inglês *human liver cells*

IAM – Infarto agudo do miocárdio

IC – Insuficiência cardíaca

IFNAR – Receptor interferon alfa/beta, do inglês *interferon-alpha/beta receptor*

INF – Interferon, do inglês *interferon*

MDA – Malonaldeído, do inglês *malonaldehyde*

MGD – Banco de dados do genoma de ratos, do inglês *mouse genome database*

MOI – Multiplicidade de infecção, do inglês *multiplicity of infection*

mTOR – Alvo da rapamicina em mamíferos, do inglês *mammalian target of rapamycin*

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*

NBT – Nitroazul de tetrazólio, do inglês *nitro-blue tetrazolium*

NS4A - Proteína não estrutural 4A, do inglês *non-structural protein 4A*

NS4B – Proteína não estrutural 4B, do inglês *non-structural protein 4B*

PA – Pressão arterial

PFU – Unidades formadoras de placa, do inglês *plaque forming units*

PI3K – Fosfoinosítido 3-cinase, do inglês *phosphoinositide 3-kinase*

RE – Retículo endoplasmático

RT-PCR – Reação da cadeia da polimerase em tempo real, do inglês *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*

SRA – Sistema Renina-Angiotensina, do inglês *renin-angiotensin system*

SHY5Y – Células de neuroblastoma humano, do inglês *human neuroblastoma cell*

SOD – Superóxido dismutase, do inglês *superoxide dismutase*

TBA-RS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*

TLR – Receptores tipo toll, do inglês *toll-like receptor*

TNF – Fator de necrose tumoral, do inglês *tumor necrosis factor*

VSMC – Células do músculo liso vascular, do inglês *vascular smooth muscle cells*

YFV – Vírus da febre amarela, do inglês *yellow fever virus*

ZIKAVID – Banco de dados da infecção pelo Zika vírus, do inglês *Zika virus infection database*

ZIKV – Vírus Zika, do inglês *Zika virus*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Zika vírus

O Zika vírus (ZIKV), como outros flavivírus, é um vírus de RNA de sentido positivo de cadeia simples contendo um genoma de 10.794 kb. Pode ser transmitido por cinco espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, dentre elas o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Kraemer, 2015). Foi identificado pela primeira vez em 1947 quando encontrado em macacos da espécie *Macaca mulatta*, na floresta de Ziika da Uganda (Dick *et al.*, 1952). O primeiro estudo filogenético do ZIKV foi realizado por Lanciotti *et al.*, (2008) após o primeiro surto do vírus em 2007, na ilha de Yap, localizada na Micronésia. Ao realizarem o sequenciamento, descobriram três linhagens diferentes de ZIKV: leste africana, oeste africana e asiática.

Entre 2013 e 2014, surgiram epidemias na Polinésia Francesa com uma estimativa de 30.000 infecções sintomáticas (Cao-Lormeau *et al.* 2013; Musso *et al.*, 2014). Pequenos surtos ocorreram em meados de 2014 e 2015 em países do Pacífico Sul como Nova Caledônia, Ilha de Páscoa, Ilhas Salomão e Fiji (Musso & Gubler, 2016).

O Ministério da Saúde do Brasil e a Organização Pan-Americana da Saúde notificaram a primeira febre autóctone do Zika, confirmada em um paciente da Bahia, em 2015 e o número de infectados cresceu exponencialmente ao longo do eixo das Américas, tomando proporções mundiais em 2016 (WHO, 2016b). No fim do mesmo ano o número de casos suspeitos aumentou de 440.000 para 1.300.000 e dezoito estados

comprovaram a transmissão do vírus nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste, Centro Oeste e Sul (Hennessey, Fischer, Staples, 2016).

Pesquisadores acreditavam que o vírus teria chegado ao Brasil durante a Copa do Mundo de Futebol de 2014, embora países do Pacífico não tenham participado da competição. Contudo, estudos filogenéticos apontam que o vírus pode ter sido introduzido no país, no mesmo ano, durante o período que sediou o Campeonato Mundial de Canoagem com a participação de países com grande circulação do ZIKV (Polinésia Francesa, Ilhas Caledônia, Ilhas Cook e Ilhas de Páscoa) (Musso, 2015).

Acredita-se que o potencial de disseminação do vírus no Brasil ocorra devido aos seus vetores, que são amplamente distribuídos pelo país: *A. aegypti* e *A. albopictus*. O *A. aegypti* circula principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Leste Central (Coelho, 2012), já o *A. albopictus* encontra-se com maior frequência em regiões subtropicais, principalmente no Sul do Brasil (Carvalho, Lourenço-de-Oliveira, Braga, 2014).

Os sintomas causados pelo Zika são semelhantes a outras infecções causadas por arbovírus, como dengue e chikungunya (Paixão *et al.*, 2016). Em humanos, as manifestações clínicas são brandas e incluem dor de cabeça, febre baixa, dores leves musculares, nas articulações, olhos e exantema maculopapular (Roos, 2016). O vírus pode estar presente nos fluídos corporais como sangue, urina, sêmen (transmissão sexual), saliva, líquido amniótico e leite materno (Foy *et al.*, 2011; Musso & Gubler, 2016; MacDonald & Holden, 2018). Embora 80% das pessoas infectadas não desenvolvam tais sintomas, a associação entre a infecção pelo ZIKV durante a gestação e microcefalia congênita foi alvo de preocupação de saúde pública nas Américas Central e Sul (Oliveira *et al.*, 2016; MacDonald & Holden, 2018).

A partir de setembro de 2015, relatos do aumento do número de crianças nascidas com microcefalia em áreas afetadas por ZIKV começaram a surgir. No Brasil, mais de 4.590 nascidos vivos com esta malformação congênita foram notificados ao Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2020). No estado de Pernambuco, somente no mês de novembro de 2015

foram 141 casos suspeitos e depois inúmeros casos foram registrados nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte (Oliveira & Vasconcelos, 2016).

O Instituto Evandro Chagas ao isolar o ZIKV do cérebro de um recém-nascido que veio a óbito detectou o vírus no licor, cérebro, coração, pulmão, fígado, rim e baço (Kindhauser *et al.*, 2016). O estudo de Oliveira e colaboradores identificou o ZIKV no líquido amniótico de duas gestantes do estado da Paraíba que tinham histórico de doenças exantemáticas, posteriormente seus fetos foram diagnosticados com microcefalia por ultrassonografia fetal (Oliveira *et al.*, 2016).

Além das doenças congênitas, a infecção pelo vírus pode ocasionar depósito de cálcio no cérebro, má formação das estruturas cerebrais, excesso de líquido nas cavidades, desenvolvimento ocular anormal entre outros problemas (Oliveira *et al.*, 2016). Estudos em animais (Cugola *et al.*, 2016) e em células progenitoras neurais e organoides cerebrais (Miner *et al.*, 2016), mostraram o potencial infectivo do ZIKV em tecidos neurais e apresentam possíveis mecanismos patogênicos, seja por via da resposta inflamatória ou por apoptose. Ainda quanto à patogênese, algumas células primárias ou linhagens celulares imortalizadas foram descritas como suscetíveis ao ZIKV (Barr *et al.*, 2016). Entre elas destacam-se a maior capacidade de replicação do vírus em células da pele (Hammel *et al.*, 2015) e células epiteliais pulmonares (Frumence *et al.*, 2016).

Em camundongos da linhagem A129, nocauteados para receptor IFN- α / β , quando infectados com o ZIKV, o RNA viral pode ser encontrado no cérebro, nos ovários, no baço e no fígado (Dowall *et al.*, 2016). Um estudo avaliou a capacidade de replicação do ZIKV em queratinócitos (HaCaT), neuronais (N29.1 e SHSY5Y), pulmonares, renais e linhagens celulares bem estabelecidas como 293T (rim embrionário humano), CHO (ovário de hamster chinês), Vero (células de rim de *macaco* verde africano), A549 (linhagem tumoral de pulmão), HepG2C3A (linhagem tumoral hepática), Huh7.5 (linhagem hepatocelular humana) e COS7 (fibroblastos derivados de rim de macaco). Todas as linhagens celulares investigadas, exceto células CHO, se mostraram suscetíveis à replicação e liberação do ZIKV (Himmelsbach & Hildt, 2018). El

Costa e colaboradores verificaram que o vírus almeja tipos celulares fundamentais como macrófagos, fibroblastos, trofoblastos, bem como células estromais mesenquimais (El Costa *et al.*, 2016).

Mesmo sendo considerado um vírus neurotrópico e embora linhagens celulares cardíacas sejam pouco estudadas, pesquisadores apontaram uma possível relação entre a infecção pelo ZIKV e complicações cardíacas. Logo, a microcefalia é apenas a “ponta do iceberg” dentre uma série de complicações que podem estar associadas à infecção (Glenn, 2017).

1.2 Doenças cardiovasculares e infecção pelo Zika vírus

Segundo a OMS, a cada ano, mais pessoas morrem por doenças cardiovasculares (DCV) do que por outra causa. Os óbitos são decorrentes principalmente de acidentes vasculares cerebrais e doenças isquêmicas do coração. Ainda, 75% dessas mortes ocorrem em países subdesenvolvidos de baixa e média renda. Nas Américas, as DCV são a principal causa de morte, levando a óbito 2 milhões de indivíduos por ano (OPAS, 2021).

No Brasil, as DCV são as principais causas de óbito, a estimativa é que até 2040 o aumento dessas doenças seja de até 250%. Segundo o Ministério da Saúde, em torno de 300 mil pessoas sofrem de infarto agudo do miocárdio (IAM) por ano e, dentre estas, 30% vão a óbito. Durante o ano de 2021, cerca de 230 mil brasileiros morreram em decorrência das DCV, um aumento de 6,8% em relação ao ano de 2020 (Guedes, 2021).

No Rio Grande do Sul, nas últimas décadas, o aumento da expectativa de vida, conseqüentemente o envelhecimento da população associado à crescente prevalência dos fatores de riscos cardiovasculares, como a hipertensão e o diabetes, são os principais responsáveis pelo impacto crescente das doenças cardiovasculares. Desde 2019, doenças do aparelho circulatório são a segunda maior causa de internações hospitalares da população gaúcha e, mesmo em 2020, ano auge da pandemia pela COVID-19, as internações por doenças do aparelho circulatório foram maiores do que as por doenças infecciosas e doenças do aparelho respiratório, sendo

responsáveis por 21,9% dos óbitos no Rio Grande do Sul no ano de 2020 (Relatório Anual de Gestão –SES/RS-2020).

Este cenário pode vir a ser ainda mais preocupante devido às evidências que apontam para o desenvolvimento de problemas cardíacos relacionados com a infecção pelo ZIKV. A Tabela 1 apresenta uma relação dos estudos publicados que relatam uma possível associação entre a infecção pelo ZIKV e o desenvolvimento de DCV.

Autor	Tipo do estudo	País / Ano	n	Resumo
Xiao-Feng Li <i>et al.</i>	Estudo experimental	China, 2016	5	Inoculação viral em <i>Macacos rhesus</i> , avaliação da resposta imune e infecção em diferentes órgãos. O ZIKV foi detectado no coração desses animais no 5º dia de infecção por PCR em tempo real (RT-PCR).
Aletti <i>et al.</i>	Relato de caso	França, 2016	1	Um paciente de 45 anos relatou sintomas de febre, mialgia, cefaleia, diarreia e dor torácica. Diagnóstico de miocardite e dilatação cardíaca após 10 dias com base na análise de eletrocardiograma (ECG), troponina I elevada e atividade da enzima creatinofosfoquinase (CPK) aumentada. ZIKV detectado por RT-PCR.
Carta <i>et al.</i>	Estudo observacional prospectivo	Venezuela, 2017	9	Nove pacientes infectados com ZIKV submetidos a exames laboratoriais, ECG, ecocardiograma e ressonância magnética. As complicações cardíacas mais frequentes foram arritmia cardíaca (presente em oito pacientes) e insuficiência cardíaca (presente em seis pacientes).
Angelidou <i>et al.</i>	Relato de caso	Estados Unidos, 2017	1	Mulher grávida infectada no primeiro trimestre de gravidez. Confirmação de microcefalia fetal. Os testes de RT-PCR para ZIKV no feto foram negativos, mas IgM positivo para flavivírus. O ecocardiograma pós-natal revelou síndrome de hipoplasia miocárdica esquerda com atresia mitral e aórtica, aorta gravemente hipoplásica e insuficiência tricúspide moderada, que foram corrigidas cirurgicamente

				aos 10 dias de vida. Cinco meses depois, diagnóstico de estenose de veia pulmonar.
Di Cavalcanti <i>et al.</i>	Estudo observacional retrospectivo	Brasil, 2017	103	O relatório descreve os achados ecocardiográficos de 103 bebês com síndrome de ZIKV congênita. A tomografia, o ecocardiograma e os exames sorológicos mostraram que 14 eram portadores de cardiopatia congênita, 9 apresentavam defeito no septo ventricular e 5 no septo atrial.
Waggoner <i>et al.</i>	Relato de caso	Estados Unidos, 2017	1	Mulher de 45 anos com sintomas de febre, dores nas articulações, erupções cutâneas e dores no peito. ZIKV detectado por teste sorológico positivo para IgM. Um paciente com prolapso da válvula mitral relatou história familiar de doença cardiovascular. Com níveis normais de troponina I e CPK-MB; os achados clínicos revelaram pericardite aguda.
Abdalla <i>et al.</i>	Relato de caso	Brasil, 2017	1	Homem de 49 anos, sem história de doenças cardiovasculares, hospitalizado com sintomas de erupções cutâneas, dores de cabeça e no corpo, febre e hipertensão. ZIKV detectado em amostras de saliva por RT-PCR. ECG e radiografia de tórax normais, porém, após ressonância magnética, foi diagnosticado microangiopatia supratentorial bilateral.
Marques <i>et al.</i>	Estudo prospectivo observacional	Venezuela, 2018	6	Todos os pacientes infectados com ZIKV desenvolveram insuficiência cardíaca. Destes, quatro já haviam contraído dengue, porém, após a infecção pelo ZIKV, foram detectadas novas arritmias. Ecocardiograma, angiografia coronariana e ressonância magnética cardíaca detectaram insuficiência cardíaca em cinco pacientes, fibrilação atrial em dois pacientes e taquicardia ventricular em um paciente.
Orofino <i>et al.</i>	Estudo transversal	Brasil, 2018	120	Infecção por ZIKV confirmada por RT-PCR em amostra de sangue de mães, no líquido amniótico durante a gravidez ou em amostras de urina após o nascimento. Das 120 crianças nascidas, 97 tiveram PCR positivo para ZIKV, 84 tiveram microcefalia e 25 tiveram exposição vertical. Os exames ecocardiográficos mostraram que 48 tinham problemas cardíacos.

Rajahram <i>et al.</i>	Relato de caso	Malásia, 2019	1	Homem de 61 anos com história de doença renal crônica, hipertensão e cardiopatia isquêmica. Ele apresentou febre, dores no corpo, erupções cutâneas, calafrios e rigidez há três dias. O ZIKV foi detectado por RT-PCR no soro e na urina. A radiografia de tórax mostrava cardiomegalia, o ECG mostrava fibrilação atrial e o ecocardiograma mostrava hipocinesia com dilatação das câmaras cardíacas. Elevação da troponina I também foi observada. Na autópsia, várias anomalias cardíacas foram detectadas, com detecção de ZIKV no fígado, baço e coração.
Ramacciotti <i>et al.</i>	Estudo transversal	Brasil, 2019	31	Depois de analisar os níveis de dímero D em 172 pacientes infectados com Zika e Chikungunya, 31 foram confirmados com ZIKV por PCR. O dímero D apresentou níveis elevados em 19,4% dos pacientes infectados com ZIKV. Dois indivíduos infectados com ZIKV desenvolveram trombose venosa profunda.
Arrais <i>et al.</i>	Estudo transversal	Brasil, 2021	71	Infecção por ZIKV confirmada em amostra de sangue das mães. Das 71 crianças nascidas, todas com microcefalia, 7 apresentaram cardiopatia leve apresentando hipertensão pulmonar leve, forame oval patente, persistência do pequeno canal arterial, pequeno defeito do septo atrial e estenose pulmonar leve.
Herry <i>et al.</i>	Estudo prospectivo	Brasil, 2021	21	De todos os pacientes 13 eram positivos para ZIKV e 2 destes possuíam microcefalia. Os pacientes apresentaram variação da frequência cardíaca após exposição ao vírus.

Tabela 1- Artigos que relatam / avaliam a associação entre o Zika vírus e doenças cardiovasculares.

Além dos defeitos congênitos relacionados ao ZIKV, as complicações cardiovasculares mais prevalentes relatadas nos estudos clínicos são arritmia, insuficiência cardíaca e elevação do dímero D. Além de outros sintomas, os pacientes apresentaram crise hipertensiva, cardiomiopatia dilatada, cardiomegalia, pericardite, hipocinesia global e pré-eclâmpsia (Tabela 2).

Manifestações clínicas	Nº. de casos	Autores
Dor no peito	2	Aletti, 2017 Waggoner, 2017
Arritmias	15	Abdalla, 2018 Carta, 2017 Marques, 2018 Rajahram, 2019
Cardiomiopatia dilatada	2	Rajahram, 2019 Aletti, 2017
Insuficiência cardíaca	13	Carta, 2017 Marques, 2018 Rajahram, 2019
Elevação dímero-D	6	Ramacciotti, 2019
Derrame pericárdico (leve ou grave)	2	Waggoner, 2017 Marques, 2018
Outros (crise hipertensiva, miocardite, cardiomegalia, sobrecarga de líquidos, pericardite, hipocinesia global e pré-eclâmpsia)	5	Abdalla, 2018 Aletti, 2017 Marques, 2018 Rajahram, 2019 Waggoner, 2017

Tabela 2 - Potenciais complicações cardiovasculares da infecção pelo zika vírus. FOP (forame oval persistente); PCA (persistência do canal arterial); DSV (defeito do septo ventricular.); DSA (defeito do septo atrial).

Embora os achados de Di Cavalcanti (2017), Angelidou (2018) e Orofino (2018) sugiram uma alta prevalência de cardiopatias congênitas em pessoas infectadas pelo ZIKV, pouca atenção tem sido dada ao sistema cardiovascular em adultos infectados.

Considerando os graves danos que outros flavivírus, como dengue e febre amarela podem causar ao tecido cardíaco, em 2016 Krittanawong, Zhang e Sun publicaram uma carta ao editor lançando alerta de subdiagnóstico para possíveis complicações cardíacas decorrentes da infecção pelo ZIKV e chamaram a atenção à escassez de estudos a respeito dessa possível relação. No mesmo ano, Joob e Wiwanitkit (2016) levantaram a hipótese de que, devido ao tamanho reduzido do ZIKV (40nm), ele infectaria o tecido cardíaco com mais facilidade.

As complicações cardíacas de diferentes infecções virais por arbovírus apresentam semelhanças. Apesar da grande variedade de apresentação

clínica inicial da cardiomiopatia inflamatória secundária à infecção viral, a miocardite pode se manifestar com frequentes arritmias e insuficiência cardíaca, sintomas prevalentes nos estudos realizados. A miocardite viral geralmente progride em dois estágios, embora o mecanismo fisiopatológico exato em humanos ainda não seja totalmente compreendido. Primeiramente, a infecção causa dano direto ao miocárdio por necrose dos cardiomiócitos, associada à isquemia e disfunção endotelial; posteriormente, as respostas imunes do hospedeiro levam a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e 2), fator de necrose tumoral (TNF) e interferons (INF). Os danos podem evoluir para o desenvolvimento de tecido fibrótico, devido à deposição de colágeno, dilatação miocárdica e insuficiência cardíaca (IC) (Salgado *et al.*, 2010; Tisoncik *et al.*, 2012; Navinan *et al.*, 2015).

O número de artigos científicos que associam o ZIKV às doenças cardiovasculares é escasso. Logo, pesquisas mais aprofundadas sobre essa associação são necessárias, bem como avanços na compreensão da fisiopatologia do ZIKV, vias de sinalização e diagnóstico precoce, além do tratamento direcionado.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos recentes apontam para uma possível associação entre o ZIKV e DCV, já que os pacientes após serem infectados apresentaram complicações como arritmias, insuficiência cardíaca e miocardite. Entretanto, até o momento, são poucos os trabalhos que tenham focado na fisiopatologia do ZIKV e sua relação com o surgimento de DCV, demonstrando uma escassez de informações sobre o tropismo viral às células cardíacas e quais danos o ZIKV pode ocasionar ao sistema cardiovascular. Diante disto, são necessários experimentos *in vitro* e *in vivo* que investiguem o desenvolvimento de DCV após a infecção pelo ZIKV.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a suscetibilidade de cardiomioblastos murinos da linhagem H9c2 e de células de músculo liso aórtico murino da linhagem A7r5, bem como, analisar as respostas cardiovasculares frente à infecção pelo ZIKV-BR em camundongos imunocompetentes.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a carga viral e cinética de proliferação do vírus ZIKV-BR nas linhagens celulares H9c2 e A7r5;
- Detectar o vírus nas linhagens infectadas com marcador PKH26;
- Verificar a atividade da lactato desidrogenase nas linhagens infectadas;
- Analisar o estresse oxidativo nas linhagens celulares após infecção pelo ZIKV;
- Quantificar a carga viral em camundongos imunocompetentes (FVB/N) inoculados com ZIKV-BR;
- Verificar a expressão de troponina T nos animais infectados;
- Verificar as atividades enzimáticas protrombóticas e fibrinolíticas nos animais infectados;
- Analisar estresse oxidativo em camundongos imunocompetentes após infecção pelo ZIKV;
- Analisar *in silico* a correlação entre a infecção pelo ZIKV e doenças cardiovasculares, e infecção pelo ZIKV e estresse oxidativo.

PARTE II

4. Artigo a ser submetido no Journal of Molecular and Cellular Cardiology

4.1 Avaliação da infecção *in vivo* e *in vitro* pelo vírus Zika no desenvolvimento de doenças cardiovasculares

Fernanda Marques da Silva¹, Markus Berger², Thais Fumaco Teixeira³, Letícia Rodrigues³, Ana Paula Muterle³, Rafael Marschner², Rafael Ribeiro², Rafael da Rosa³, Walter Beys-da-Silva³, Paulo Michel Roehe³, Diogo Souza³, Carlos Alberto Saraiva Gonçalves³, Patrícia Sesterheim¹.

1. Centro de Cardiologia Experimental – Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia do Rio Grande do Sul.

2. Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA.

3. Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

INTRODUÇÃO

O Zika vírus (ZIKV) foi identificado em 1947 em macacos do gênero *Rhesus* na floresta de Zika na Uganda [1]. O vírus inicialmente era endêmico da África e Ásia, porém começou a aparecer com maior incidência na América Latina. Dentre os países da América do Sul, o Brasil foi o que teve maior concentração de infecções, sendo considerado o país com a primeira epidemia significativa de ZIKV atingindo cerca de 1,5 milhão de pessoas [2].

O ZIKV é considerado um vírus neurotrópico e está associado a complicações como microcefalia, Síndrome de Guillain-Barré e meningoencefalite [3,4]. As manifestações clínicas do ZIKV são neurológicas e congênitas, porém pesquisadores apontam uma possível relação entre a infecção pelo ZIKV e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). No entanto, desde a década de 70 sabe-se que os flavivírus podem ocasionar danos ao miocárdio, provocando o desenvolvimento de miocardite [4-6]. Estudos de caso apontam que o ZIKV também pode ocasionar complicações cardíacas como arritmias, insuficiência cardíaca, fibrilação, miocardite, impacto hemodinâmico entre outras manifestações clínicas [7-11].

Embora haja um grande número de relatos de pacientes com complicações cardíacas após a contaminação por ZIKV, poucas pesquisas experimentais buscam investigar esta relação. Desta forma, este estudo teve como objetivo analisar as respostas cardiovasculares, particularmente frente à infecção pelo ZIKV brasileiro (ZIKV-BR) em camundongos imunocompetentes, como também analisar a suscetibilidade e permissividade de cardiomioblastos murinos da linhagem H9c2 e células de músculo liso aórtico murino da linhagem A7r5 na infecção pelo ZIKV.

MATERIAIS E MÉTODOS

Células

H9c2 é uma linhagem de células de mioblastos cardíacos embrionários de rato (ATCC:CRL-1446). A7r5 (ATCC:CRL-1444) é uma linhagem de células

do músculo liso vascular (VSMC), obtidas da aorta torácica de rato. Vero-E6 (ATCC:CRL-1586) são células renais de macaco verde africano. As células foram cultivadas rotineiramente em meio DMEM high glucose contendo 2 mM de L-glutamina e 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e penicilina/estreptomicina (Gibco) a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO².

Vírus

A cepa ZIKV 17SM foi isolada em 2016, na cidade de São Paulo, Brasil, de um paciente (no dia 4 após os primeiros sintomas de Zika). A cepa foi propagada em Vero-E6 e os estoques virais foram armazenados a -80°C até o uso. Os experimentos envolvendo vírus infecciosos foram aprovados pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) e conduzidos no laboratório de Biossegurança nível 2 do Centro de Cardiologia Experimental do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul (Brasil).

Infecção das linhagens celulares com ZIKV

As células foram semeadas em placas de 24 poços e infectadas pelo ZIKV em diferentes multiplicidades de infecção (MOI) de 1, 0,1 e 0,001 em meio sem soro por 1h a 37°C. Em seguida, adicionou-se DMEM fresco e as células foram incubadas em diferentes tempos (24h,48h,72h e 96h) a 37°C. As placas foram congeladas a -80°C e o sobrenadante foi utilizado para análise de carga viral, título viral, atividade da lactato desidrogenase e estresse oxidativo.

Análise por RT-PCR

As amostras foram submetidas à extração de RNA total com TRIzol (Ambion), seguindo as orientações do fabricante. O RNA total extraído foi submetido à transcrição reversa com primers específicos para Zika vírus utilizando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied

Biosystems™). Os primers e sondas específicos para ZIKV são previamente descritos na literatura [12].

Titulação viral

O ensaio de placa foi usado para determinar a concentração do ZIKV. Seis placas de seis poços foram semeadas com 10^6 células Vero-E6/poço e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO² por 1 hora. Após a adsorção do vírus, o inóculo foi removido e DMEM suplementado com agarose de baixo ponto de fusão (1%) e penicilina/estreptomicina foi adicionado. As placas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO² por 5 dias. Após a incubação, as células foram fixadas com formaldeído a 3,7% à temperatura ambiente durante a noite. Posteriormente, as placas foram coradas com cristal violeta a 0,4%. As placas visíveis foram contadas e a concentração viral calculada em unidades formadoras de placa (PFU)/ml.

Marcação de partículas virais de ZIKV com PKH26

O corante PKH26 foi dissolvido em 2 ml de Diluente C (Sigma) imediatamente antes da marcação. Em um *ependorf* foram adicionados um volume de suspensão de ZIKV mais dois volumes de PKH26 misturados por pipetagem [13]. Após 1 minuto a marcação do vírus foi parada ao adicionar três volumes de DMEM com soro. Para infecção foi utilizado MOI 1 de ZIKV com título 1×10^7 e as linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 24 poços, a quantidade por poço foi de 3×10^5 células. As células foram infectadas e incubadas por 1h a 37°C em um termostato úmido a 5% de CO², após o período de adsorção o sobrenadante foi retirado e se adicionou 500 µL de DMEM com soro. As amostras foram fixadas após 24h, removendo o DMEM e acrescentando 200 µL de paraformaldeído a 4%, também foi acrescentado PBS com triton para permeabilização. As amostras foram mantidas a 4°C durante 24h. Após remoção do paraformaldeído foi adicionado o corante Hoechst, sendo este incubado por 2 minutos em um agitador. O excesso de

corante foi removido por lavagem com PBS. As amostras foram semeadas em lamínulas (dentro do poço) e depois invertidas sobre uma lâmina para posteriormente serem visualizadas pela digitalização confocal a laser Olympus FluoView 1000 microscópio.

Atividade da lactato desidrogenase

A atividade de LDH dos sobrenadantes infectados de linhagens celulares (MOI 1) por diferentes períodos de tempo (24, 48, 72 e 96h), foi medida conforme o determinado pelo kit Sigma Aldrich (Catálogo No-MAK066) no qual o LDH reduz o NAD a NADH e é detectado especificamente por ensaio colorimétrico em microplaca. A absorbância inicial foi medida a 450 nm (A450) inicial.

Redução de tetrazólio nitroazul

As células foram incubadas com tetrazólio nitroazul (NBT) 0,1% (1 mg / ml) a 37 C° / 5% CO² durante 1 h. O NBT foi removido e as células foram lavadas com PBS e depois com 70% de metanol seguido de resfriamento rápido com 100% de metanol resfriado. KOH 2 M e DMSO foram usados para dissolver os cristais. A absorvância foi medida a 620 nm no leitor de microplaca Synergy H1.

Oxidação proteica

A concentração de carbonilas foi determinada conforme o método de Levine *et al.*, (1994) [14]. Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas em 1 mL de tampão Tris-HCl 1 M contendo EDTA 50 mM, fluoreto de fenilmetano sulfonil 100 mM (PMSF) e 100 mM Benzamidina. O homogenato foi centrifugado a 11.000 g por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes (500 µL) foram misturados com 10% (p/v) de sulfato de estreptomicina por 15 min para remoção dos ácidos nucleicos. Após nova centrifugação, os sobrenadantes

foram misturados com 500 mL de TCA a 20% por 15 minutos adicionais. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram dissolvidos em 500 µL de 2,4-dinitrofenil-hidrazina 10 mM (DNPH) em HCl 2 M. As amostras foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 20%, após, os sedimentos foram lavados três vezes com 1 mL de etanol. Os pellets foram dissolvidos em uréia 6 M e a absorbância foi medida a 370 nm usando espectrofotômetro. A concentração de carbonila foi mensurada através do coeficiente de absorção molar para alifáticos e expressa em nmol carbonil / mg de proteína.

Análise *in silico* da infecção por ZIKV e correlação com estresse oxidativo

O banco de dados Mouse Genome Database (MGD; <http://www.informatics.jax.org>) foi usado como fonte de genes envolvidos com o estresse oxidativo [15]. Um total de 682 genes relacionados ao estresse oxidativo foram extraídos da categoria “genes relacionados ao estresse oxidativo” para *Rattus norvegicus* com a categorização ontológica específica de cada grupo de genes.

O Zika Virus Infection Database (ZIKAVID), um banco de dados que contém todos os genes diferencialmente expressos identificados após a infecção por ZIKV em artigos publicados em níveis de mRNA e proteína em diferentes hospedeiros [16], foi usado como fonte de genes relacionados à infecção por ZIKV. O ZIKAVID está disponível em <https://zikavid.org> e contém 16.984 entradas de medição de expressão gênica de um total de 7.348 genes. A lista de genes do ZIKAVID foi comparada com os genes do estresse oxidativo do MGD para verificar as atribuições correspondentes e consequentemente categorizar os genes diferencialmente expressos na infecção pelo ZIKV ao estresse oxidativo.

Análise *in silico* da infecção por ZIKV e correlação com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares

O MalaCards é um banco de dados sobre doenças humanas e contém uma lista de doenças especializadas e gerais, incluindo doenças raras e genéticas. Também apresenta conexões entre doenças habilitadas no banco de dados GeneCards, realizando um compilado completo de informações sobre cada patologia. Assim como na análise de estresse oxidativo, a lista de genes do ZIKAVID foi comparada aos genes de doenças cardiovasculares presentes na base de dados do MalaCards.

Animais

Camundongos fêmeas FVB/N com dez semanas de idade foram obtidos do Centro de Cardiologia Experimental (Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Brasil). Eles foram alojados sob condições de 12h de luz, 12h de escuro a uma temperatura constante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ com livre acesso a ração comercial e água. Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelos Comitês de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul (5705/19).

Infecção intraperitoneal de camundongos por ZIKV e coleta de amostras

Camundongos fêmeas (n=8), com 80 dias de idade, foram inoculadas com 10^5 PFU de ZIKV-BR via intraperitoneal no volume final de 100 μL . Os animais do grupo controle (n=8) foram inoculados com 100 μL de DMEM sem soro via intraperitoneal. Após 96 horas de infecção (hpi) foi realizada a coleta de sangue e posteriormente os animais foram eutanasiados para coleta do tecido cardíaco e tecido esplênico, estes foram armazenados à -80°C para análises posteriores.

Análise por RT-PCR e isolamento viral

Foram realizados ensaios de RT-PCR em tempo real e isolamento viral em triplicata. Amostras de sangue, baço e coração de três camundongos foram utilizadas para detecção e quantificação do ZIKV 24 horas pós-infecção. Para o isolamento viral, baço e coração foram macerados com pistilo em DMEM sem soro. O conteúdo macerado foi clarificado e semeado em células Vero-E6 e estas foram incubadas a 37°C em atmosfera de CO² para adsorção do vírus durante 1h. O inóculo foi retirado e se adicionou 3 mL de DMEM sem soro. Após 96h a placa foi congelada e 24h depois foi descongelada para coleta do sobrenadante e realização da 2ª passagem. Após cinco passagens, o protocolo de titulação viral foi realizado para detectar a presença do ZIKV.

Quantificação de troponina T (cTnT)

A veia submandibular foi usada para coleta de sangue (96 horas após a infecção) para quantificação da troponina T cardíaca (cTnT) no analisador de imensaio Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Análise da atividade das enzimas protrombóticas e fibrinolíticas no tecido cardíaco

Os corações foram dissecados, reduzidos a pequenas partes (aproximadamente 1mm) e lavados em solução Ringer. Posteriormente foram homogeneizados em tampão RIPA na ausência de inibidores de protease e usando um homogeneizador tipo Ultra Turrax. Posteriormente as amostras foram centrifugadas 12000 rpm/4°C e o sobrenadante foi recolhido. A dosagem de proteína total foi feita através do método do ácido bicinconínico (BCA). Para aceleração do desenvolvimento da coloração, realizou-se o protocolo de incubação em temperatura ambiente por duas horas, 37°C por 30 minutos e 600°C por 30 minutos. Após incubação, foram resfriados a temperatura ambiente e 58 absorvâncias lidas imediatamente. A curva padrão foi feita com albumina bovina (BSA), solução padrão incluída no kit. Em cada ensaio foi

utilizado à mesma quantidade de proteína de todas as amostras (30 µg), utilizando substratos cromogênicos ou fluorogênicos específicos para cada enzima (trombina, plasmina, vasopressina, calicreína, fator X ativado (FXa) e aminopeptidases).

No ensaio de atividade FIX cromogênica, o primeiro estágio consiste em misturar o plasma de teste com FXIa, FVIII, trombina (FIIa), protrombina (FII), FX, fosfolípidios e cálcio, o que leva à ativação de FX dependente de FIX (FXa). Durante o segundo estágio, um inibidor de enzima fora do alvo (não FXa) e um substrato cromogênico específico para o FXa são adicionados, e os níveis de atividade do FXa são quantificados pela monitoração da clivagem do substrato do peptídeo cromogênico. A cinética de cada uma das reações foi acompanhada através da liberação de p-nitroanilina (a 405 nm) ou β-naftilamina (360 nm /460 nm) utilizando um espectrofotômetro de microplacas de 96 poços. Os resultados foram expressos em termos de velocidade enzimática (mOD/min) normalizados pela quantidade de proteína presente em cada poço.

Análise do conteúdo de sulfidril e carbonila

O teor de sulfidril no homogenato de tecido cardíaco (contendo ~0,3 mg de proteína) foi determinado conforme descrito por Aksenov e Markesbery [17]. A diferença entre as amostras tratadas com 2,4-dinitrofenilhidrazina e tratadas com HCl (branco) foi usada para calcular o teor de carbonilas determinado a 370 nm. Os dados obtidos foram calculados usando o coeficiente de absorção milimolar da hidrazina ($\epsilon_{370 \text{ nm}} = 21,000000 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), e os resultados foram expressos em nmol carbonil/mg de proteína.

Níveis de glutatona (GSH)

Os níveis de GSH foram medidos de acordo com o método descrito por Browne e Armstrong (1998) [18]. A absorbância foi medida a 420 nm em um

leitor de microplacas usando glutathione reduzida como padrão externo (0,001-1 mM). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

As concentrações de malonaldeído (MDA) foram medidas utilizando o método de Yagi (1998) [19]. A fluorescência da fase orgânica foi lida a 515 e 553 nm como comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente. Uma curva de calibração foi realizada com 1,1,3,3-tetrametoxipropano e submetido ao mesmo tratamento que o sobrenadante. Os níveis de MDA foram calculados como nanomoles de MDA por mg de proteína.

Níveis de glutathione peroxidase (GPx)

O ensaio de glutathione peroxidase (GPx) foi realizado de acordo com Wendel (1981) [20] usando terc-butil-hidroperóxido como substrato. A atividade específica foi calculada como U por miligrama de proteína.

Determinação da superóxido dismutase (SOD)

As amostras do tecido cardíaco foram homogeneizadas em PBS a pH 6,5 na proporção de 1:10 (mg/ml) em um homogeneizador Politron e centrifugadas (9.700xg, 20 min, 4°C). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida pela capacidade desta enzima de inibir a auto oxidação do pirogalol. A concentração de enzima que inibiu a reação em 50% (IC50) foi definida como uma unidade de SOD, expressa como unidade de atividade de SOD por mg de proteína total (unidades SOD/por mg de proteína) [21].

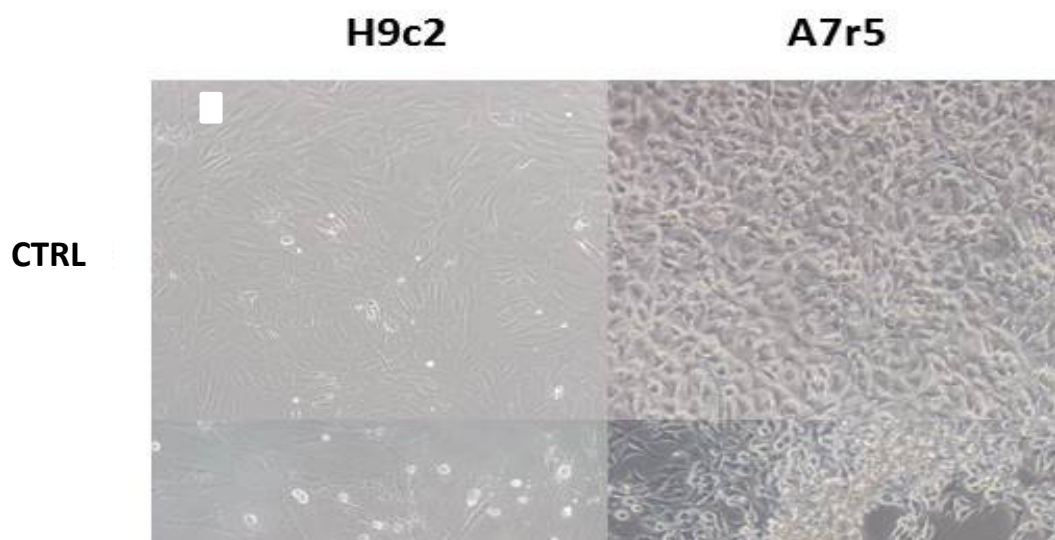
Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão, e as diferenças significativas foram analisadas usando ANOVA de uma via seguida de um teste *t* não pareado com correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Valores de *p* de 0,05 foram considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

As linhagens celulares apresentaram características citopáticas de infecção viral (Fig. 01), sendo possível observar um rearranjo celular, com alteração morfológica mínima, apresentando vacuolização e formação de sincícios. A análise molecular indica que os cultivos celulares foram suscetíveis ao ZIKV, levando à infecção produtiva e liberação da progênie viral infecciosa (Fig. 02A). Analisando o processo de formação de partículas infectantes virais, verificou-se que a linhagem H9c2 produziu uma quantidade de vírus significativamente superior à A7r5, na qual, mesmo sendo detectado o RNA genômico viral, não foi possível verificar um aumento significativo de título viral ao longo do tempo (Fig. 02B). Assim, esses resultados demonstram que células H9c2 são susceptíveis e permissivas à infecção pelo ZIKV e que este é capaz de se multiplicar de forma eficiente nessas células atingindo títulos satisfatórios. A adsorção e internalização do vírus pelas células infectadas foram confirmadas pelo marcador fluorescente PKH26 (Fig.03). Ainda, foi observada perda da integridade celular (Fig. 04), sem qualquer alteração no ensaio de redução do MTT (Fig. 05).

Figura 01:
Efeito



citopático (ECP) de ZIKV (MOI 1) nas diferentes linhagens celulares após 72 horas. Controle negativo células H9c2 e A7r5 40x; ECP padrão de ZIKV nas células H9c2 e A7r5 40x.

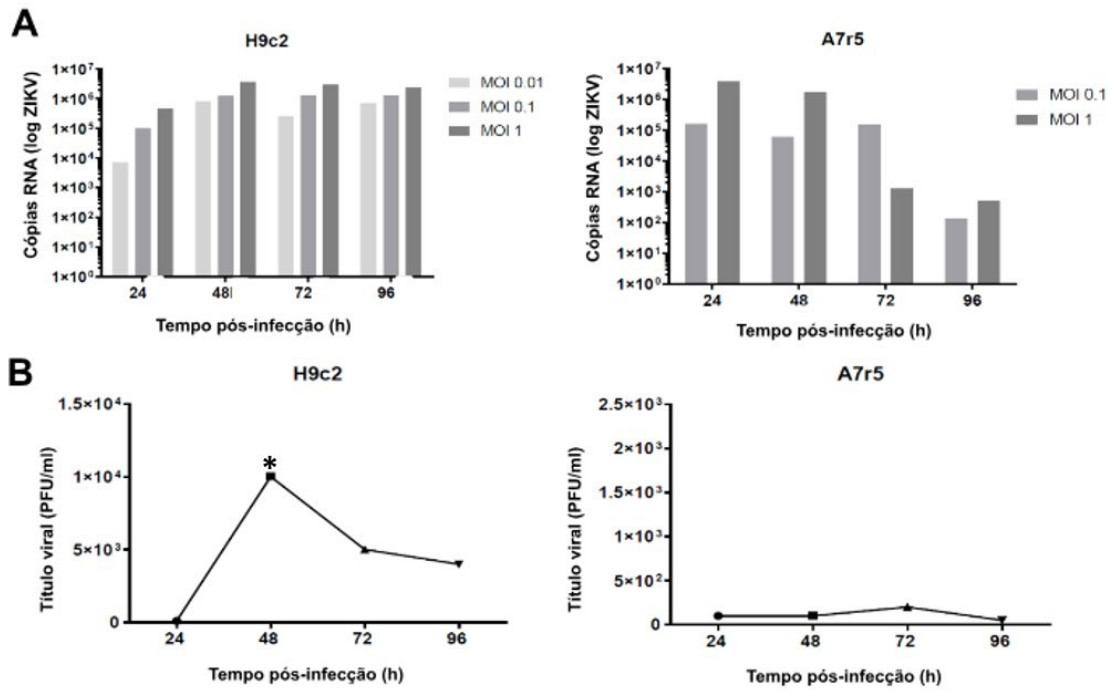


Figura 02: Suscetibilidade e permissividade à infecção pelo ZIKV nas linhagens celulares H9c2 e A7r5. A) Quantificação de carga viral de ZIKV em H9c2 e A7r5. B) Quantificação de partículas infecciosas de ZIKV através do ensaio de placa em células infectadas com MOI 1 * $p < 0,01$.

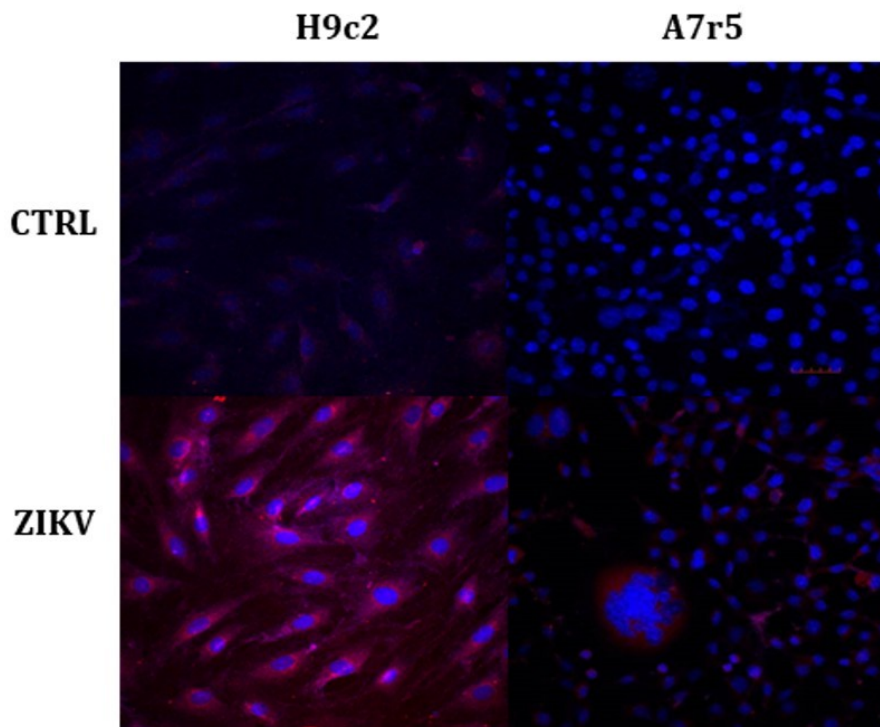


Figura 03: Imagens confocais representativas de partículas virais de ZIKV positivas para PKH26 nas linhagens celulares H9c2 e A7r5.

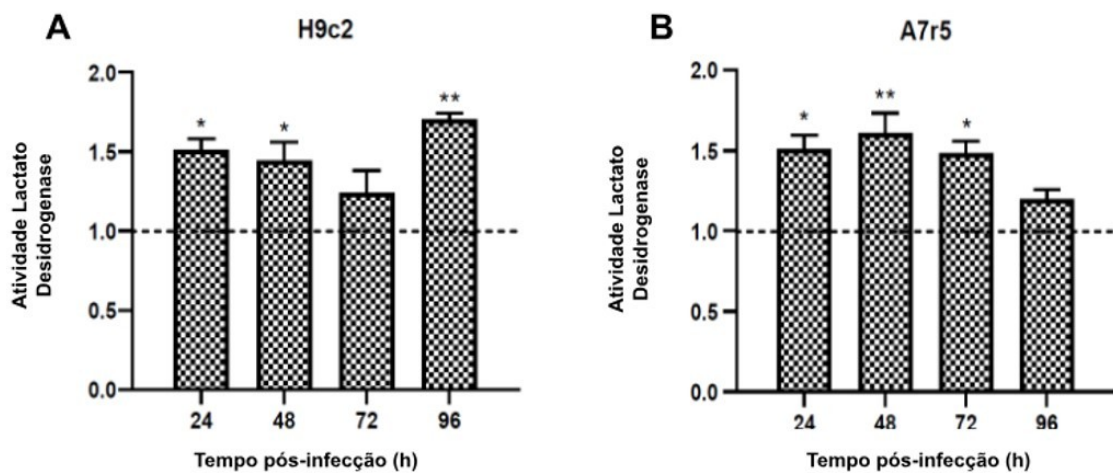


Figura 04: Atividade da lactato desidrogenase após infecção pelo ZIKV nas linhagens celulares H9c2 (A) e A7r5 (B). A linha indica o valor do controle e os dados representam a média \pm

desvio padrão das amostras experimentais em triplicata. A análise estatística foi por ANOVA de uma via, os valores considerados significativos foram de $p < 0,05$.

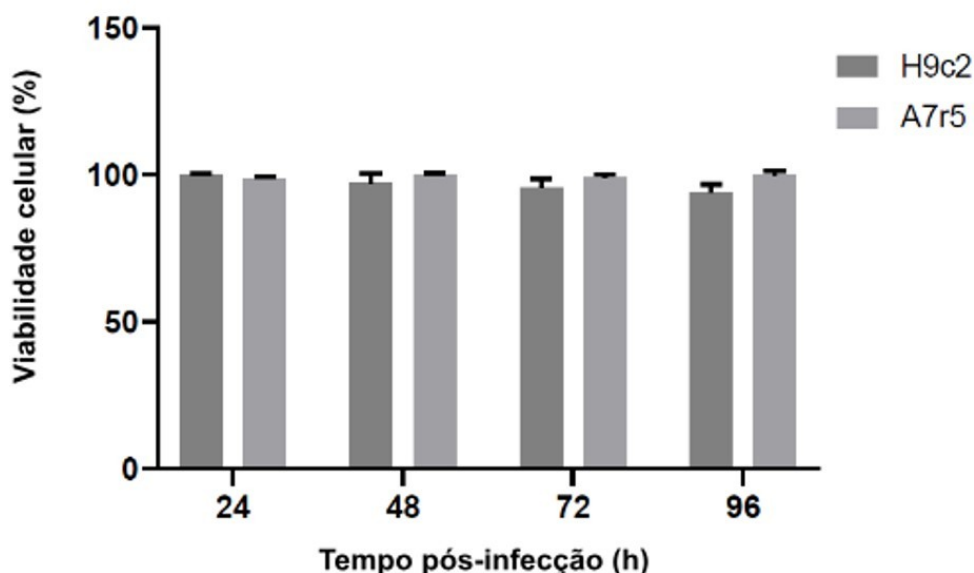


Figura 05: Viabilidade celular das linhagens celulares A7r5 e H9c2 após 24h, 48h, 72h e 96 horas de infecção pelo ZIKV. Ensaio de MTT com dados expressos como % de viabilidade celular e apresentados como média \pm desvio padrão.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é um fenômeno comum em infecções virais e tem como finalidade conter a infecção. Assim, analisamos o estresse oxidativo celular avaliando os níveis do biomarcador de oxidação proteica (proteína carbonila) nas células infectadas. A infecção pelo ZIKV resultou em um aumento significativo do conteúdo carbonil nas linhagens celulares (Fig.06A) e exibiram metabolismo oxidativo funcional através da fotorredução do NBT (Fig.06B). Logo, podemos inferir que a infecção pelo ZIKV em células das linhagens H9c2 e A7r5 é capaz de culminar com maior produção de ERO e consequente estresse oxidativo.

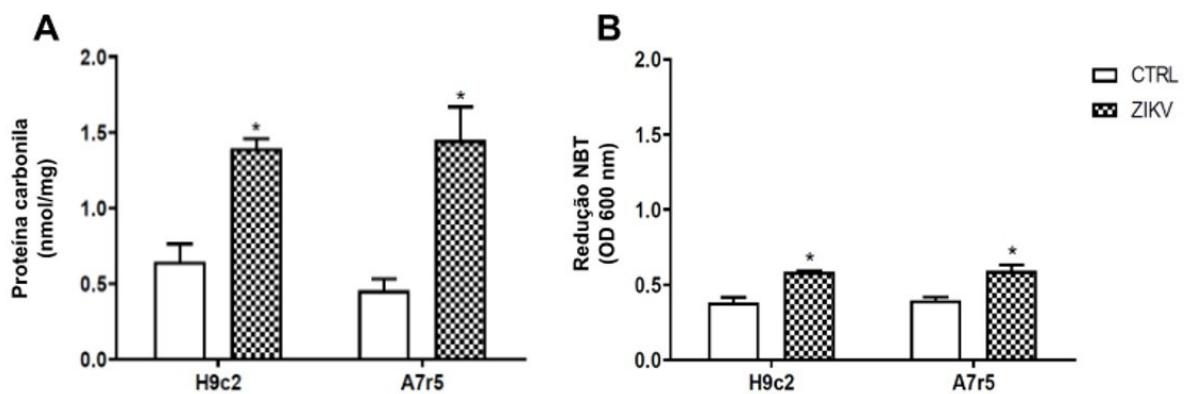


Figura 06: Estresse oxidativo celular. A) Conteúdo da proteína carbonil nas linhagens celulares H9c2 e A7r5. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão e apresentados como nanomoles de carbonil/mg de proteína. B) Ensaio de redução de NBT como índice de produção de ânion superóxido. A análise estatística foi por ANOVA de duas vias onde os valores significativos observados foram de $p < 0,05$.

No estudo *in vivo*, coletamos e analisamos sangue, baço e coração de camundongos FVB/N, 24 horas após inoculação com 10^5 PFU de ZIKV. Analisado por RT-PCR, apenas o tecido esplênico das fêmeas infectadas foi positivo e apresentou carga viral de $1.12 \times 10^3 \pm 1.04 \times 10^3$ (média \pm desvio) \log_{10} copies/mL respectivamente (Fig.07). Para o isolamento viral, células Vero-E6 foram incubadas com o homogenato de baço ou coração e observadas diariamente até o aparecimento do ECP. Após uma semana de incubação, reconhecemos pequenos focos de células arredondadas e refrativas destacando-se da monocamada (Fig.08A). Estas placas de cultura foram expostas a ciclos de congelamento-descongelamento e seus sobrenadantes foram acrescentados às culturas de novas células Vero-E6. Esse procedimento foi repetido quatro vezes consecutivas. Ao utilizarmos este método direto de diagnóstico virológico, por ensaio de formação de placa, detectamos a formação de partículas infectantes virais tanto no coração (5×10^2 PFU) quanto no baço (2×10^1 PFU) (Fig.08B).

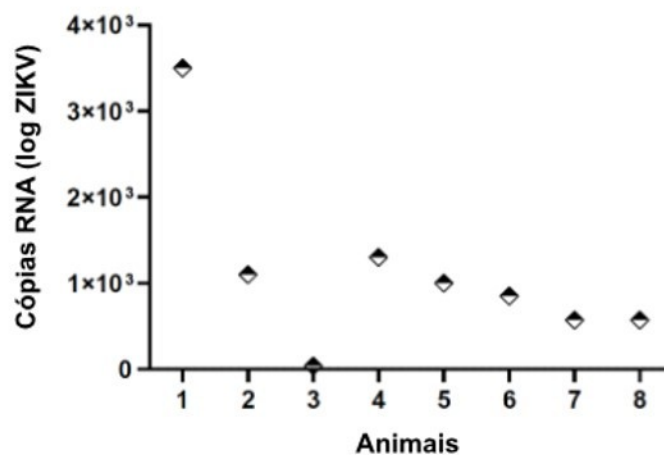


Figure 07: Detecção de genoma viral no tecido esplênico de camundongos imunocompetentes após 24 horas de inoculação com 10^5 PFU de ZIKV. Os dados apresentados tiveram média \pm desvio padrão de $1.12 \times 10^3 \pm 1.04 \times 10^3 \log_{10}$ cópias/mL.

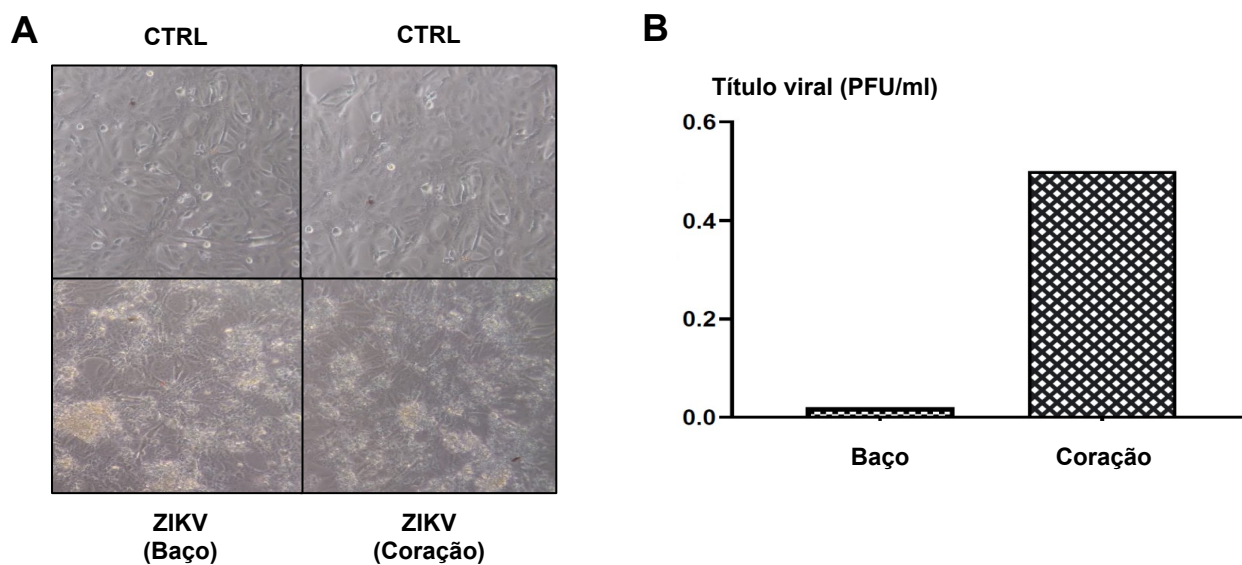


Figura 08: Isolamento viral do ZIKV no tecido esplênico e cardíaco de animais imunocompetentes. A) Células Vero-E6 em contato com o homogenato de baço e coração observa-se pequenos focos de células arredondadas e refrativas destacando-se da monocamada das amostras ZIKV em comparação com o controle. B) Detecção de título viral através do ensaio de formação de placa, evidenciando a formação de partículas infectantes virais no tecido esplênico (2×10^1 PFU) e cardíaco (5×10^2 PFU).

Os níveis séricos de cTnT 96 hpi foram significativamente maiores nos animais infectados, indicando possivelmente a ocorrência de injúria miocárdica após a infecção pelo ZIKV (Fig.09). Ao analisar as enzimas pró-coagulantes e fibrinolíticas, constatou-se que o FXa e consequentemente a trombina estavam significativamente elevados no grupo de fêmeas infectadas (Fig.10A, Fig.10B). Por outro lado, a presença do vírus ZIKV nas fêmeas levou a uma diminuição da enzima plasmina responsável pela degradação da fibrina (Fig.10C), indicando um desequilíbrio entre fatores pró-coagulantes e pró-fibrinolíticos, levando a um estado pró-trombótico.

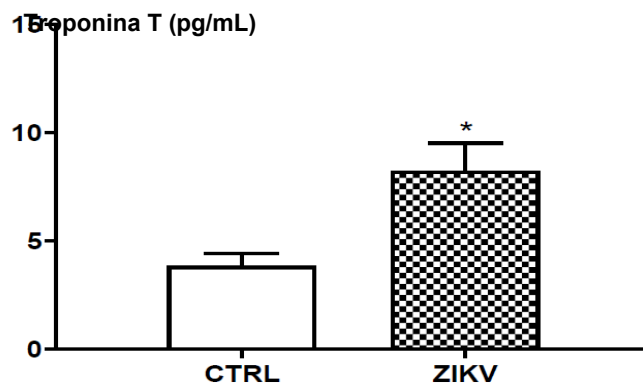


Figura 09: Níveis de troponina T no soro de animais imunocompetentes controle e infectados com o ZIKV. Os dados estão representados como média \pm erro padrão. A análise estatística foi por Test t de duas vias onde os valores significativos observados foram de $p > 0,05$.

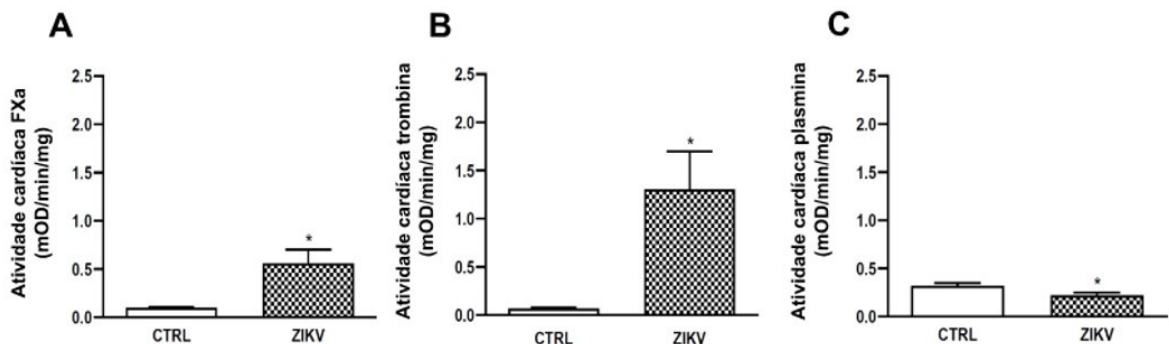


Figura 10: Níveis de enzimas pró-coagulantes e fibrinolíticas no tecido cardíaco de animais imunocompetentes durante a infecção pelo ZIKV. Seus níveis foram determinados com base em sua atividade sobre substratos cromogênicos específicos. A) Fator Xa. B) Trombina. C)

Plasmina. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Análise estatística através do Teste *t* com valores significativos de $p < 0,05$.

Ao observar as alterações nos mecanismos de coagulação, após infecção pelo ZIKV, os níveis de caliceína no tecido cardíaco foram analisados, apresentando-se reduzidos no grupo ZIKV quando comparados com o grupo controle (Fig.11). Já as aminopeptidases, responsáveis pela conversão de angiotensina III em vasopressina, tiveram sua atividade aumentada na presença do vírus (Fig.12B, Fig.12C). A aminopeptidase capaz de degradar a vasopressina é a cistina-aminopeptidase (CAP) (Fig. 12A), que apresentou níveis de atividade enzimática significativamente baixos no tecido cardíaco dos animais infectados. Tais achados podem evidenciar um estado hipertensivo nestes animais após infecção pelo ZIKV.

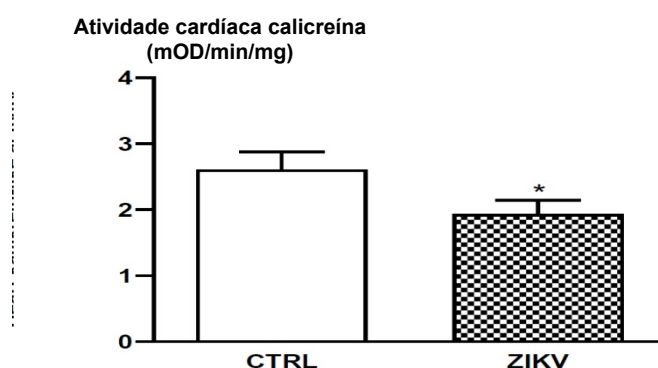


Figura 11: Atividade de caliceína no tecido cardíaco de animais imunocompetentes controle e infectados com ZIKV. Os dados estão representados por média \pm desvio padrão e análise estatística feita através de Teste *t* com valores significativos de $p < 0,05$.

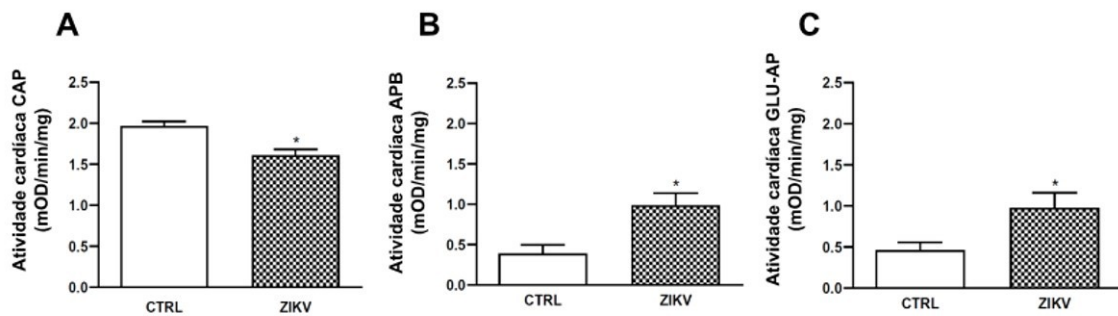


Figura 12: Atividade das aminopeptidases no tecido cardíaco de animais imunocompetentes controle e infectados pelo ZIKV. A) CAP; B) APB; C) GLU-AP. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão e análise estatística feita através de Teste *t* com valores significativos de $p < 0,05$.

Assim como nos resultados *in vitro*, os animais também apresentaram índices significativos de estresse oxidativo após a infecção pelo ZIKV. Houve correlação entre a atividade da GPx e SOD e seus níveis nos tecidos cardíacos infectados (Fig.13 A,B) apresentaram uma diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), bem como uma diminuição nos níveis de glutathiona (Fig.13 C). A infecção pelo ZIKV aumentou a formação de grupamentos carbonila (Fig.13D), alterando o conteúdo de grupamentos sulfidril (Fig.13E). A infecção não elevou o dano lipídico basal, visto que não houve diferença estatística nos níveis de TBA entre o grupo controle e infectado (Fig.13F).

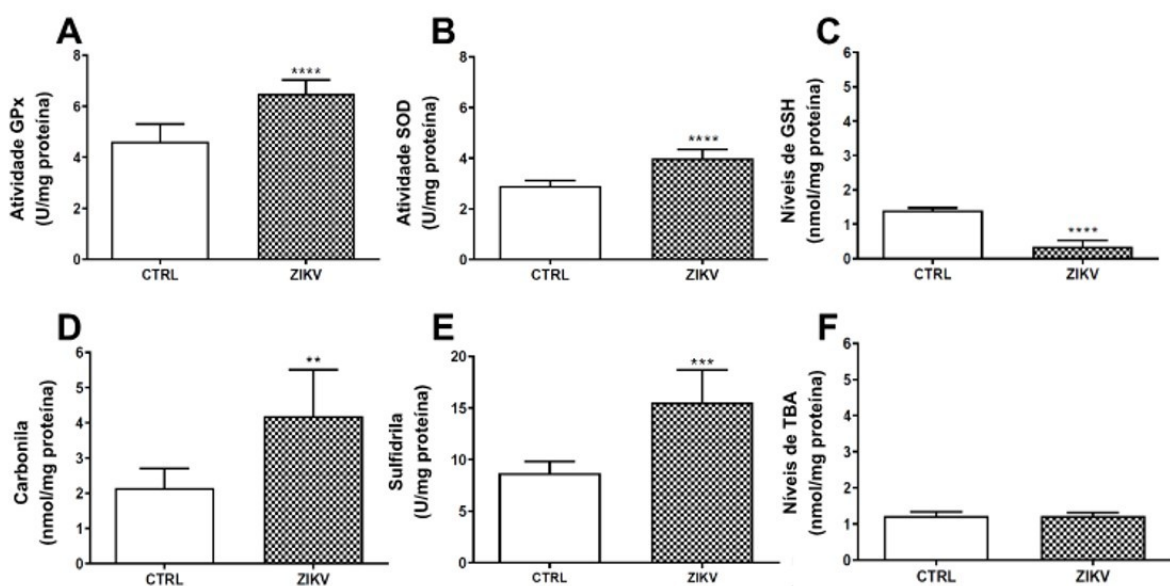


Figure 13: Estresse oxidativo no tecido cardíaco de animais imunocompetentes após infecção pelo ZIKV. A) Atividade da GPx; B) Atividade da SOD; C) Níveis de GSH; D) Carbonila; E) Sulfidril; F) Níveis de TBA. Resultados expressos em nmol/mg proteína e U/mg proteína, representados em média \pm desvio padrão. Análise estatística por Teste *t* com valores significativos de $**p<0,01$, $***p<0,001$ e $****p<0,0001$.

Na análise de genes relacionados ao estresse oxidativo, dos 682 genes encontrados no MGD, 206 foram identificados no ZIKAVID (Fig.14A) mostrando forte correlação da infecção do ZIKV com o desequilíbrio oxidativo no hospedeiro, corroborando com os dados encontrados nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. As rotas metabólicas afetadas por esses genes (Fig.14B) são em grande parte relacionadas à “resposta ao estresse oxidativo”. Em relação à correlação entre doenças cardiovasculares e infecção pelo ZIKV, verifica-se que a maioria dos genes estão relacionados a acidente vascular isquêmico, doença cerebrovascular, hipertensão pulmonar e cardiomiopatia hipertrófica. Cerca de 390 genes (51%) relacionados com doenças cardiovasculares foram encontrados no ZIKAVID, mostrando forte correlação entre a infecção pelo ZIKV e o surgimento de patologias no sistema cardiovascular (Fig.15).

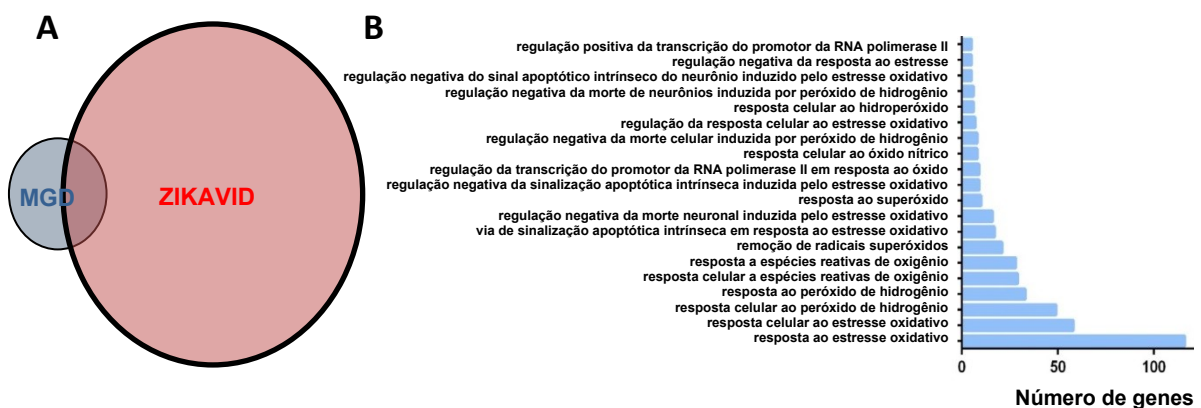


Figura 14: A) Diagrama de Venn mostrando a correlação entre os genes de estresse oxidativo de ambas as bases de dados. B) Lista de genes encontrados para estresse oxidativo na base de dados ZIKAVID.

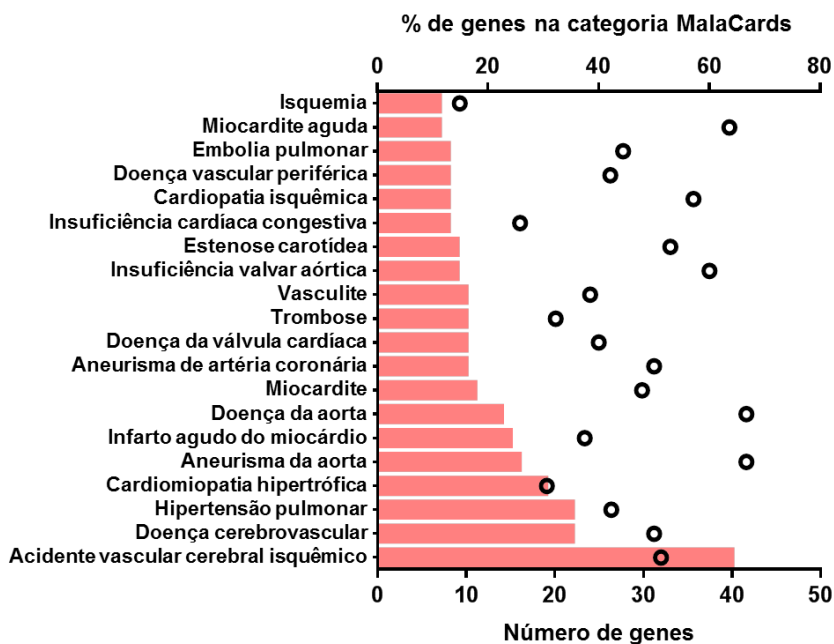


Figura 15: Listas de genes

relacionados com doenças cardiovasculares encontrados no ZIKAVID, mostrando correlação entre a infecção pelo ZIKV e o surgimento de patologias no sistema cardiovascular.

DISCUSSÃO

Evidências clínicas, biológicas e morfológicas de arritmias, impacto hemodinâmico, insuficiência cardíaca, fibrilação e miocardite, entre outras manifestações clínicas em pacientes infectados pelo ZIKV, foram relatadas na literatura [8-11]. Tais achados lançam um alerta ao subdiagnóstico para possíveis complicações cardíacas decorrentes da infecção pelo ZIKV a exemplo de outros flavivírus como da dengue (DENV) e da febre amarela (YFV).

Sabe-se que distintas linhagens celulares são suscetíveis à infecção pelo ZIKV [22], porém, só recentemente a suscetibilidade e permissividade de células cardíacas se tornaram alvo de estudos. Sob essa perspectiva,

avaliamos a suscetibilidade da linhagem celular mioblástica de embrião de rato (H9c2) e da derivada de músculo liso aórtico também murino (A7r5) ao ZIKV.

O estudo de Ambrocio *et al.* (2015) demonstrou que células H9c2 foram suscetíveis e permissíveis ao vírus da dengue [23]. Da mesma forma, em nosso estudo houve detecção de genoma viral e aumento do título viral durante as 96 horas pós-infecção. Ainda, Rossi *et al.* (2020) investigaram a infecção do ZIKV em células estromais mesenquimais cardíacas humanas, extraídas de fetos em idade embrionária [24]. Observaram que as células foram suscetíveis ao vírus, porém houve uma redução viral significativa em 96 horas pós-infecção, enquanto que em nosso estudo, houve aumento do título viral nas células da linhagem H9c2 já nas primeiras 48h.

Um dos mecanismos envolvidos na infecção do ZIKV em células H9c2 pode estar relacionado com a endocitose receptor-mediada através da ativação do receptor Gas6-AXL complexo tirosina cinase, induzindo a trimerização irreversível da proteína E, resultando na fusão do vírus com as membranas celulares. O AXL é expresso no tecido cardíaco e tem um papel conspícuo na fisiologia cardiovascular. Pesquisa realizada por Battle *et al.*, (2014) concluíram que a expressão miocárdica e a concentração sérica de AXL estão elevadas em pacientes com insuficiência cardíaca [29]. Além disso, o AXL periférico se correlaciona com parâmetros associados à progressão da doença. Estudos indicam que a via GAS6-AXL exerce efeitos antiapoptóticos e antiinflamatórios [27,28], Ainda, Wu *et al.*, (2017) verificaram que a sinalização GAS6-AXL tem ação protetora contra a isquemia miocárdica, portanto conforme a lesão no cardiomiócito maior o recrutamento de GAS6/AXL [30]. Tal expressão diferencial poderia estar relacionada com o tropismo cardíaco do ZIKV?

O estudo de Li *et al.*, (2019) aponta que, ao serem estimuladas com LPS, as células H9c2 apresentam um aumento na expressão de AXL via sinalização com o GAS6, mostrando um efeito protetor após inflamação [31]. Silva-Filho *et al.*, (2021) afirmam que o GAS6 pode agir como uma porta de entrada do ZIKV e que está associado com a patogênese da síndrome congênita [32]. Logo, a permissividade das células H9c2 à infecção pelo ZIKV se daria pela expressão de AXL via GAS6 após a infecção. Tais achados

evidenciam o potencial da linhagem H9c2 para estudos sobre a fisiopatologia cardíaca durante a infecção por flavivírus.

A expressão de GAS6 e AXL também ocorre nas células musculares lisas [33,34]. Assim, as células da linhagem A7r5 se mostraram suscetíveis ao vírus, mas menos permissíveis quando comparadas à linhagem celular H9c2, pois mesmo com a detecção do genoma viral nas primeiras 48 horas pós-infecção, houve uma redução gradual na quantidade de partículas infectantes virais. Arias-Arias *et al.* 2018 investigaram a produção de vírus e a aptidão replicativa de células do músculo liso da artéria umbilical humana (HUASMC) à infecção pelo DENV e também observaram baixa permissividade [35].

Este processo pode ocorrer devido a problemas na montagem ou na maturação dos vírions nas células infectadas. Após a endocitose receptor-mediada e a promoção da fusão entre as proteínas do envelope do vírus e a membrana endossômica, o RNA é lançado no citoplasma, seguido pela montagem da partícula viral. A replicação do genoma do ZIKV acontece nos complexos de replicação associados à membrana do retículo endoplasmático. Para a tradução (RNAm) das proteínas virais, o ZIKV utiliza a maquinaria da célula do hospedeiro (complexo de Golgi) para produzir uma única poliproteína viral que então clivada pela serina protease do vírus (NS2B-NS3) e pela protease da célula hospedeira em peptídeos individuais. Quando incorporados em virions, essas partículas são transportadas para a membrana plasmática (via secretora), passando por maturação ao longo do caminho e saem da célula por exocitose (MOHD ROPIDI *et al.*, 2020).

Neste contexto, quando avaliamos a suscetibilidade e permissividade das células A7r5, observamos que o genoma viral foi detectado em altas cargas. Durante os períodos avaliados, as células foram liberando as cópias de genoma para o meio extracelular. Porém, o processo de maturação das partículas virais não ocorreu conforme se esperava. Este fenômeno também aconteceu na infecção por DENV e pode ser a causa do baixo título viral de ZIKV nas células da linhagem A7r5, mostrando um problema de morfogênese viral nestas células [36].

A lesão celular pelo ZIKV foi determinada pela avaliação quantitativa da redução de MTT, bem como pela liberação de LDH. No teste da atividade da enzima lactato desidrogenase, as linhagens celulares apresentaram altas taxas de liberação desta enzima no período de infecção pelo ZIKV, mostrando que estas células sofreram dano estrutural, mas não funcional (MTT).

Nossos resultados demonstram o papel da infecção do ZIKV na formação de ROS em cardiomioblastos e células do músculo liso aórtico murino. As várias etapas do ciclo de replicação viral interferem na homeostase do metabolismo celular, desencadeando estresse nas células hospedeiras. Estudos mostram que a infecção pelo ZIKV desencadeia estresse no ER (retículo endoplasmático) do córtex cerebral de fetos infectados, em células-tronco neurais e em astrócitos humanos [36,37].

Os animais infectados com ZIKV apresentaram marcador de injúria celular miocárdica elevado (troponina T). Estes resultados são similares aos encontrados por Bai *et al.* 2020, que avaliaram o comprometimento cardíaco após infecção pelo ZIKV em camundongos imunodeficientes, detectando altas taxas de troponina T após a infecção [38]. Os autores afirmam que o ZIKV não foi capaz de aumentar os índices de troponina T em camundongos *wild type*, ao contrário do que foi observado nos camundongos imunocompetentes utilizados em nosso estudo após 96 horas da infecção.

O FXa é uma serina protease envolvida no processo de conversão de fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel que termina na produção de um coágulo. Além disso, o FXa desempenha um papel vital na sequência enzimática que culmina na produção do trombo. Verificamos uma ativação de enzimas pró-coagulantes em corações infectados e uma regulação negativa da fibrinólise, indicando um estado pró-trombótico. Além disso, serinoproteinasas como o FXa e a trombina são capazes de ativar os receptores PAR nas células cardíacas, desencadeando e amplificando a inflamação e a sinalização da coagulação. A regulação negativa de caliceína também indica uma redução na atividade da quinina, uma vez que esta é a principal enzima capaz de liberar bradicinina. Assim, há uma evidência de regulação negativa do sistema vasodilatador das cininas durante a infecção pelo ZIKV. Estes dados

corroboram com o estudo de Rammaciotti *et al.* 2019 que observou o aumento de dímero-D e a disfunção da cascata de coagulação após infecção por ZIKV [39], e também com o estudo de Abdalla *et al.* 2017 que verificou aumento de pressão arterial e protrombina em indivíduos infectados [40].

Até o momento, o mecanismo por trás desse desequilíbrio nos aspectos da coagulação e vasodilatação, após infecção pelo ZIKV, ainda não estão bem elucidados, mas sabe-se que outros flavivírus, como DENV e YFV amarela, causam alterações nos fatores de coagulação originando sangramentos e trombose venosa, como também disfunção vasodilatadora [39,45].

Nos resultados *in vitro* e *in vivo* encontramos aumento de estresse e produção de ERO. A desordem metabólica oriunda do estresse oxidativo ocasionado por infecções virais, principalmente com flavivírus, tem ganhado atenção nos últimos anos [46]. Foi demonstrado que alguns vírus da família Flaviviridae, como o Vírus da Hepatite C, possuem a maior parte da sua estrutura proteica voltada para a indução de estresse oxidativo [46]. Outros estudos apontam que o ZIKV pode causar inúmeros danos ao hospedeiro através da ativação de vias metabólicas oxidativas, o que justificaria os possíveis danos teciduais após a infecção [46] ou até mesmo a indução de autofagia em células progenitoras infectadas [47].

Os dados encontrados neste trabalho demonstram o desequilíbrio da homeostase em linhagens celulares cardíacas e no tecido cardíaco de camundongos, destacando a importância de estudos adicionais para elucidar os possíveis danos clínicos relacionados à infecção pelo ZIKV.

CONCLUSÃO

O ZIKV é considerado um arbovírus emergente, cuja disseminação e potencial epidemia são preocupantes, principalmente pela dificuldade no diferencial diagnóstico em regiões com circulação de outras arboviroses e a sobrecarga de serviços de saúde. Além de estar associado a sérias complicações neurológicas, o ZIKV é responsável por comprometer o

funcionamento de outros órgãos, sendo um destes o coração. Os estudos científicos até o momento buscaram associar o ZIKV a doenças cardiovasculares e verificaram em indivíduos infectados a presença de miocardites, fibrilação, impacto hemodinâmico e tropismo cardíaco. Mesmo diante do notório acometimento cardíaco, é necessário o aprofundamento de pesquisas para uma melhor compreensão da fisiopatologia do ZIKV. Por isso, neste estudo, foram desenvolvidos experimentos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*, para um entendimento mais amplo da infecção por ZIKV no tecido cardíaco.

Além de mostrar a permissividade de células cardíacas frente o ZIKV, os dados apresentados neste estudo mostram que camundongos saudáveis, imunocompetentes, apresentaram níveis elevados de marcador de injúria celular com ativação de enzimas pró-coagulantes e uma regulação negativa da fibrinólise, o que provavelmente indica um estado pró-trombótico nesses animais, evidenciando uma associação entre o vírus e complicações cardíacas. Os resultados expostos mostram que o ZIKV pode ocasionar dano cardíaco em populações saudáveis, portanto é necessário maior atenção aos sintomas cardiovasculares na prática clínica em casos de infecção pelo ZIKV.

REFERÊNCIAS

1. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952; 46 (5): 509-520.
2. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(10): 1885-1886.
3. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med.* 2016; 374:1981-1987.
4. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016; 47(1): 6-7.
5. Obeyesekere I, Hermon Y. Myocarditis and cardiomyopathy after arbovirus infections (dengue and chikungunya fever). *Brit Heart J.* 1972; 34(8):821-7. doi: 10.1136/hrt.34.8.821.

6. Obeyesekere I, Hermon Y. Arbovirus heart disease: myocarditis and cardiomyopathy following dengue and chikungunya fever--a follow-up study. *Am Heart J*; 1973; 85(2):186-94. PMID: 46888312.
7. Nagaratnam N, Siripala K, de Silva N. Arbovirus (dengue type) as a cause of acute myocarditis and pericarditis. *Br Heart J*; 1973; 35(2): 204-6. doi: 10.1136/hrt.35.2.204.
8. Krittanawong C, Zhang H, Sun T. Cardiovascular complications after Zika virus infection. *Int J Cardiol*. 2016 Oct 15;221:859. doi 10.1016/j.ijcard.2016.06.293.
9. Wiwanitkit, V. Heart rate and blood pressure in Zika virus infection: Findings? *Indian Heart J*. 2016; 68(3):380. doi: 10.1016/j.ihj.2016.03.031.
10. Minhas AM, Nayab A, Iyer S, Narmeen M, Fatima K, Khan MS, Constantin J. *Cureus*. 2017 Jun; 9(6): e1399. doi: 10.7759/cureus.1399.
11. Carta KAG, Mendoza I, Morr I, Misticchio F, Meza Y, Finizol, V, *et al*. Myocarditis, heart failure and arrhythmias in patients with Zika. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017; 69(11 Supplement), 906.
12. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, ... & Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia. *Emerging infectious diseases*. 2007 14(8), 1232.
13. Balogh A; Pap M; Markó L; Koloszar I; Csatary LK; Szeberenyi J. A simple fluorescent labeling technique to study virus adsorption in Newcastle disease virus infected cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011, 49(3), 255-259.
- 14.
15. Bult, Carol J. *et al*. Mouse Genome Database (MGD) 2019. *Nucleic Acids Research*, [S. l.], v. 47, n. D1, p. D801–D806, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky1056>
16. Rosa RL. *et al*. ZIKAVID—Zika virus infection database: a new platform to analyze the molecular impact of Zika virus infection. *Journal of NeuroVirology*, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 77–83, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-019-00799-y>
17. Aksenov, M. Y. & Markesbery, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 302, 141-145, 2001.
18. Browne RW, Armstrong D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347–352, 1998.
19. Yagi K. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 108:107–110, 1998.
20. Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325–333, 1981.

21. Marklund SL. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Lett* 184(2):237–239, 1985.
22. Himmelsbach K, Hildt E. Identification of various cell culture models for the study of Zika virus. *World J Virol.* 2018 Feb 12;7(1):10-20. doi: 10.5501/wjv.v7.i1.10.
23. Ambrocio, AH. *et al.* An embryonic heart cell line is susceptible to dengue virus infection. *Virus research*, v. 198, p. 53-58, 2015.
24. Rossi F, Josey B, Sayitoglu EC, Potens R, Sultu T, Duru AD, *et al.* Characterization of Zika virus infection of human fetal cardiac mesenchymal stromal cells. *PLoS ONE* 15(9), 2020. E0239238.
25. Batlle M, Recarte-Pelz P, Roig E, Castel MA, Cardona M, Farrero M, *et al.* AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure. *Int J Cardiol.* 2014, 15; 173(3): 402-9.
26. Goruppi S, Ruaro E, Schneider C. Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene.* 1996 Feb 1; 12(3):471-80.
27. Wu G, McBride DW, Zhang JH. Axl activation attenuates neuroinflammation by inhibiting the TLR/TRAF/NF- κ B pathway after MCAO in rats. *Neurobiol Dis.* 2018 Feb; 110():59-67.
28. Wu M, Lu S, Zhong J, Huang K, Zhang S. Protective Effects of Pterostilbene Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Inflammation.* 2017 Apr; 40(2):578-588.
29. Li M, Ye J, Zhao G, Hong G, Hu H, Cao K, Wu Y, Lu Z. Gas6 attenuates lipopolysaccharide-induced TNF α expression and apoptosis in H9C2 cells through NF- κ B and MAPK inhibition via the Axl/PI3K/Akt pathway. *Int J Mol Med.* 2019 Sep; 44(3): 982-994.
30. Silva-Filho JL, Oliveira LG, Monteiro L, Parise PL, Zanluqui NG, *et al.* Gas6 drives Zika virus-induced neurological complications in humans and congenital syndrome in immunocompetent mice. *Brain Behav Immun.* 2021 Oct; 97:260-274. doi: 10.1016/j.bbi.2021.08.008.
31. Son B, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Kojima T, *et al.* Statins Protect Human Aortic Smooth Muscle Cells From Inorganic Phosphate-Induced Calcification by Restoring Gas6-Axl Survival Pathway. *Circulation Research.* 2006; 98: 1024-1031.
32. Liao XB, Peng YQ, Zhou XM, *et al.* Taurine receptors Axl/Gas6 expression in vascular smooth muscle cell calcification model. *Amino acids.* 2010; 39, 375-383. doi: 10.1007/s00726-009-0448-z.
33. Arias-Arias JL, Vega-Aguilar F, Corrales-Aguilar E, Hun L, Loría GD, Mora-Rodríguez R. Dengue virus infection of primary human smooth muscle cells. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 Dec;99(6):1451-1457. Doi:10.4269/ajtmh.18-0175.

34. Mohd Ropidi MI, Khazali AS, Nor Rashid N, Yusof R. Endoplasmic reticulum: a focal point of Zika virus infection. *J Biomed Sci.* 2020 Jan 20;27(1):27. doi: 10.1186/s12929-020-0618-6.
35. Gladwyn-Ng I, Cordón-Barris L, Alfano C, Creppe C, Couderc T, Morelli G, Thelen N, America M, Bessières B. Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. *Nat Neurosci.* 2018 Jan;21(1):63-71. doi: 10.1038/s41593-017-0038-4. Epub 2017 Dec 11.
36. Ledur, Pítia Flores, *et al.* Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. *Scientific reports* 10.1, 2020: 1-14.
37. Bai C, Li S, Song S, *et al.* Zika virus induces myocardial immune response and myocarditis in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2020 Nov;148:103-105. doi:10.1016/j.yjmcc.2020.08.014.Epub2020Sep6.
38. Ramacciotti E, Agati LB, Aguiar VCR, Wolosker N, Guerra JC, de Almeida RP, Alves JC, Lopes RD, Wakefield TW, Comerota AJ, Walenga J, Fared J. Zika and Chikungunya virus and risk for venous thromboembolism. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2019; 25:1076029618821184. doi:10.1177/1076029618821184.
39. Abdalla LF, Santos JHA, Barreto RTJ, Souza EME, D'Assunção FF, Borges MA, Nascimento VA, Silva GAV, Souza VC, Ramasawmy R, Campi-Azevedo AC, Coelho-dos-Reis JG, Antonelli LRV, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO, Naveca FG. Atrial fibrillation in a patient with Zika virus infection. *Virol J.* 2018 Jan 25;15(1):23. doi: 10.1186/s12985-018-0938-2.
40. Vasconcelos PFC. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.
41. Pesaro AE, D'amico E, Aranha LFC. Dengue: cardiac manifestations and implications in antithrombotic treatment. 2007.
42. Oliveira GMM, Ferreira RM. Febre Amarela e Doença Cardiovascular: Uma Interseção de Epidemias. 2018.
43. Samarasekara K, Munasinghe J. Dengue shock syndrome complicated with acute liver failure and kidney injury, infective endocarditis, and deep vein thrombosis: a case report. *J Med Case Rep.* 2018 Oct 20;12(1):321. doi: 10.1186/s13256-018-1862-1.
44. Yeung W, Lye DCB, Thein TL, Chen Y, Leo YS. Blood pressure trend in hospitalized adult dengue patients. *PLoS One.* 2020 Jul 1;15(7):e0235166. doi:10.1371/journal.pone.0235166.eCollection 2020.
45. Zhang Z, Rong L, LI YP. Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2019, 1–17. doi.org/10.1155/2019/1409582.

46. Gratton R, Agrelli A, Tricarico PM, Brandão L, Crovella S. Autophagy in Zika Virus Infection: A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar; 20(5): 1048. Published online 2019 Feb 28. doi: 10.3390/ijms20051048.

PARTE III

5. DISCUSSÃO

Estudos de caso foram relatados associando impacto hemodinâmico, arritmias, insuficiência cardíaca, fibrilação e miocardite, entre outras manifestações clínicas à infecção por ZIKV. Mas, até este estudo, não se sabia se a infecção direta de células cardíacas pelo ZIKV poderia contribuir para tais achados, ou se a condição era causada tão somente pelos efeitos das

respostas imunes celulares e/ou mediadores de citocinas liberados por outros tecidos-alvo (Miner, 2017). O presente trabalho descreve a infecção direta de cardiomioblastos por ZIKV e mostra que há danos cardíacos em animais imunocompetentes infectados, caracterizados por níveis elevados de marcador de injúria celular, EROs e enzimas antioxidantes, além de um estado pró-trombótico nesses animais.

A suscetibilidade de diferentes linhagens celulares à infecção pelo ZIKV já havia sido comprovada por Himmelsbach e Hildt (2018), mostrando que o vírus foi capaz de infectar células neuronais (SHY5Y), células hepáticas humanas (Huh7.5), queratinócitos (HacaT), dentre outros. Porém, a suscetibilidade e permissividade de células cardíacas começou a ser explorada recentemente. Rossi *et al.* (2020) verificaram em seu estudo que em células estromais mesenquimais derivadas de coração fetal humano, o ZIKV se replicou atingindo um pico de infecção em 48 hp, seguido por morte celular em 72 hpi. Ainda, o ZIKV utilizou o receptor AXL para infectar as células com sucesso. Os autores concluíram que a infecção e replicação do ZIKV têm o potencial de induzir problemas cardíacos através da indução de morte celular e modulação do fenótipo de células estromais mesenquimais cardíacas.

Neste estudo, a linhagem H9c2 (cardiomioblastos), além de apresentar suscetibilidade ao ZIKV, se mostrou permissível, ou seja, o vírus realizou seu ciclo de replicação e liberou partículas virais. A carga viral do ZIKV se manteve elevada durante as 96 horas observadas e ainda houve aumento do título viral em 48 horas com liberação de partículas infectantes. A linhagem celular H9c2 é muito utilizada em estudos com foco em DCV, em 2015 o estudo de Ambrocio *et al.*, (2015) teve como objetivo verificar se as células H9c2 eram suscetíveis e permissíveis ao DENV, sendo este o primeiro trabalho que utilizou essas células na infecção por flavivírus. Os resultados mostram que a linhagem H9c2 teve suscetibilidade pelo vírus da dengue e que este conseguiu completar ciclo replicativo.

Um dos supostos mecanismos que podem facilitar a entrada do vírus nas células H9c2 está relacionado com a ativação do receptor tirosina cinase (AXL) via o gene-6 específico para parada de crescimento (GAS6). O GAS6 é

uma proteína composta por um domínio Gla N-terminal e após sofrer γ -carboxilação neste domínio se torna capaz de interagir com os receptores da família TAM (Tyro3, Axl e Mer) e a fosfatidilserina. Durante a morfogênese viral, o ZIKV é capaz de obter do lúmen do retículo endoplasmático (RE) lipídios de carga negativa como a fosfatidilserina. A fosfatidilserina presente nas partículas imaturas do ZIKV é capaz de enganar as células hospedeiras aumentando o potencial de infecção do ZIKV em diferentes tecidos (Liu *et al.*, 2016; Gratton, 2019). Ainda, ela poderá se ligar ao GAS6 ativando a internalização fagocítica de corpos apoptóticos que será mediada pela clatrina, este processo levará a perturbação do sistema imune e como consequência ocorrerá à ativação dos reguladores negativos de citocinas antivirais, como por exemplo, o interferon tipo I (IFNAR) que será regulado negativamente (Meertens, *et al.* 2017; Chen 2018; Hastings, *et al.* 2019). Ainda, a relação dos receptores TAM via GAS6, em células do sistema imune, poderá resultar em uma inibição de respostas inflamatórias que são conduzidas pelos receptores Toll-like (TLR) e as vias de sinalização do IFN tipo I. O ZIKV ao ser endocitado ativa os receptores TLR3 que são um dos vários tipos de receptores responsáveis pelo início da resposta inflamatória após a infecção (Triantafyllou *et al.* 2005), ainda, se sabe que células cardíacas podem expressar TLR3 e TLR7, dois receptores fundamentais para o reconhecimento de flavivírus.

O receptor AXL pode interferir no processo de replicação do ZIKV de duas maneiras, a primeira é promovendo a ligação e a internalização do vírus, e proporcionar a replicação viral através da ativação do AXL para antagonizar a via do IFN tipo I (Xie, *et al.* 2021). Porém, alguns estudos mostram resultados que instigam dúvidas sobre o papel do AXL na infecção pelo ZIKV (Govero *et al.*, 2016; Wells *et al.*, 2016; Miner *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017), como o estudo de Hastings *et al.*, 2017 que inocularam o vírus em camundongos com deleção de AXL e não encontraram diferenças significativas de genoma viral no baço e cérebro dos animais infectados e controles. Ao analisar estes resultados o questionamento é se o ZIKV precisa do AXL no processo de infecção. Em relação a isso vale salientar que existem outros receptores utilizados pelo ZIKV durante o processo de infecção, em alguns tipos celulares a deleção do gene

AXL não impediu entrada do vírus, mas em outras células a ausência de AXL causou a inibição da infecção pelo ZIKV (Brindley *et al.*, 2011; Richard *et al.*, 2017). Portanto, mais do que estar relacionado com a entrada do vírus o receptor AXL pode estar envolvido também no processo replicativo viral.

O AXL além de ser expresso no tecido cardíaco tem um papel importante na fisiologia cardiovascular, Battle *et al.*, (2014) mostraram que a concentração sérica de AXL está significativamente elevada em pacientes com insuficiência cardíaca, e que conforme a progressão da doença maior a expressão do receptor. Além disso, De Berge *et al.*, (2021) em seu modelo de cardiomiopatia isquêmica verificaram a alta expressão de AXL em macrófagos cardíacos após lesão, e níveis elevados do ligante GAS6 também foram observados em pacientes com insuficiência cardíaca (Caldentey *et al.* 2019). Wu *et al.*, (2017) observaram que a sinalização da via Gas6/AXL pode ser protetora contra a isquemia miocárdica, assim quanto maior a lesão no cardiomiócito maior será o recrutamento de GAS6/AXL. Li *et al.*, (2019) verificaram que quando as células H9c2 eram estimuladas com LPS apresentavam um aumento significativo na expressão de AXL via a sinalização de Gas6, mostrando um efeito protetor após a inflamação. Silva-Filho *et al.*, (2021) explicam que na patogênese da síndrome congênita a porta de entrada para o ZIKV foi o GAS6. Com base nesses estudos, a permissividade das células H9c2 frente à infecção pelo ZIKV poderia ocorrer pela expressão de AXL via GAS6 após a infecção.

As células A7r5 foram suscetíveis ao vírus, porém não foram tão permissíveis quando comparadas com a linhagem celular H9c2. O genoma viral foi detectado no período observado, mas houve uma redução gradual na quantidade de partículas infectantes virais, evidenciando que o ZIKV não conseguiu realizar seu ciclo replicativo de forma efetiva. A linhagem celular A7r5 apresenta a via de sinalização AXL/GAS6, visto que são células musculares lisas vasculares. Quando este tipo celular sofre com algum tipo de estímulo, lesão ou algo que desencadeie a produção de mediadores inflamatórios, imediatamente o AXL e seus ligantes estarão relacionados no processo de reparo. A expressão de AXL aumentou em células musculares

lisas após lesão na carótida de ratos (Melaragno *et al.*, 1998; McShane *et al.*, 2019). A suscetibilidade destas células (A7r5), assim como nas H9c2, pode ocorrer também pela expressão da via AXL/GAS6. Arias-Arias *et al.*, (2018) investigaram a aptidão replicativa de células musculares lisas infectadas pelo vírus da dengue (DENV), assim como neste estudo, o genoma viral foi detectado em altas cargas durante o período de infecção, porém o processo de maturação dos vírions não ocorreu conforme esperado, visto que as cargas de titulação viral foram baixas, mostrando a falta de permissividade das células ao longo da infecção pelo DENV.

A morfogênese viral é o processo no qual ocorrerá a montagem das partículas virais, sendo a parte final do ciclo replicativo. As partículas virais serão montadas na superfície do retículo endoplasmático, dando origem a um vírus imaturo, ou seja, ainda não é infeccioso (Lin *et al.*, 2017). Este vírus será transportado pelas redes do complexo de Golgi, estas apresentam um pH ácido propício para que ocorra o rearranjo das proteínas presentes no envelope e a clivagem proteolítica. Após esse processo as partículas serão liberadas via exocitose, para que não ocorra à montagem das partículas virais, algum problema morfológico ou funcional, deve estar ocorrendo com as células da linhagem A7r5, portanto ela não apresentou permissividade ao ZIKV, mesmo sendo suscetível (Lin *et al.*, 2017).

Nossos resultados demonstram o papel da infecção do ZIKV na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em cardiomioblastos murinos e células do músculo liso aórtico murino. As várias etapas do ciclo de replicação viral interferem na homeostase do metabolismo celular, desencadeando estresse nas células hospedeiras. Inúmeros vírus de RNA de cadeia positiva, como o ZIKV, dependem das membranas do RE para se replicarem, tais processos estarão envolvidos no desenvolvimento de estresse oxidativo nestas células (Zhang *et al.*, 2019). A relação entre estresse oxidativo e a infecção pelo ZIKV ainda não está bem estabelecida, mas o estudo de Gladwyn-Ng *et al.*, (2018) mostrou que o ZIKV desencadeia estresse no RE no córtex cerebral de fetos humanos pós-morte infectados, como também em células-tronco neurais humanas infectadas. Sabe-se que o estresse do RE e o

estresse oxidativo estão relacionados com doenças que envolvem infecção viral (Chen, Burr, McGuckin, 2018).

Analisando os resultados *in vivo* verifica-se que o ZIKV foi detectado no tecido esplênico de animais imunocompetentes, mas não no tecido cardíaco e soro, porém foram detectadas partículas infectantes virais no coração e baço, através da técnica de isolamento viral, evidenciando de que por mais que não tenha sido detectado genoma viral pela técnica de PCR no coração, o ZIKV realizou o seu ciclo replicativo com sucesso no tecido.

Além disso, os animais infectados apresentaram marcador de injúria celular miocárdica elevado (troponina T), estes achados são similares aos encontrados por Bai *et al.*, (2020), porém vale ressaltar que seu estudo verificou animais imunodeficientes e nos animais imunocompetentes não encontraram resultados significativos de troponina T (TnT) após infecção, já em nosso estudo após 96h de infecção os níveis de TnT se mostraram significativamente elevados. Em relação às doenças cardiovasculares a TnT é um marcador de extrema importância, aparecendo em evidência durante a insuficiência cardíaca e infarto agudo do miocárdio (IAM) (Park *et al.*, 2017). Os níveis de troponina aumentam diante de um processo de necrose miocárdica, onde a TnT apresenta um pico de elevação até 48h após o aparecimento dos sintomas e estes podem se manter por até 10 dias (de Miranda & Lima, 2014), mas durante a infecção pelo ZIKV verifica-se que os níveis de TnT podem permanecer elevados por até 15 dias (Bai *et al.*, 2020). Nossos resultados indicam que o ZIKV infectou o tecido do miocárdio como também ocasionou lesão miocárdica.

Durante a infecção pelo ZIKV em humanos, verifica-se que os pacientes apresentaram aumento de dímero D, disfunção da cascata de coagulação (Ramaciotti, 2019), aumento da pressão arterial e protrombina (Abdalla, 2018), logo buscamos investigar se animais imunocompetentes infectados com ZIKV também apresentariam tais desfechos. O FXa desempenha um papel vital na sequência enzimática que culmina na produção do trombo, já que é uma serina protease envolvida no processo de conversão do fibrogênio solúvel em fibrina insolúvel terminando na produção do coágulo. Ainda, o Fxa junto com o seu

cofator FVa irá formar um complexo denominado protrombinase que atuará sobre a protrombina, convertendo-a em trombina (Chapin & Hajjar, 2015; Pant, Kopec, Luyendyk, 2018). Observou-se uma ativação de enzimas pró-coagulantes nos corações infectados e também uma regulação negativa da fibrinólise, indicando um estado pró-trombótico após infecção pelo ZIKV. Durante as infecções virais, a ativação do sistema de coagulação pode servir como uma forma de defesa do organismo na tentativa de impedir sua disseminação (Subramaniam & Scharrer, 2018). Porém, essas infecções podem causar lesões teciduais e assim desequilibrar os sistemas de coagulação e fibrinolítico.

A regulação negativa da calicreína encontrada nos indivíduos infectados indica uma redução na atividade da cinina já que esta é a principal enzima capaz de liberar bradicinina. Acredita-se que o sistema calicreína-cinina no tecido cardíaco possa exercer um papel protetor sendo capaz de retardar o desenvolvimento de insuficiência cardíaca e minizar os danos ao tecido durante o IAM (Hamid *et al.*, 2020). Os estudos mostram que o sistema calicreína-cinina pode aumentar o fluxo sanguíneo, reduzir a área lesionada durante o IAM e participar do processo de remodelação do ventrículo esquerdo após a lesão (Magrini *et al.*, 1987; Ruocco *et al.*, 1995; Hamid *et al.*, 2020). Logo, a regulação negativa é uma evidência de que o sistema vasodilatador de cininas durante a infecção pelo ZIKV está desregulado.

Além disso, observa-se um aumento significativo das aminopeptidases APB e GLU-AP, mas uma diminuição de CAP em animais infectados. No sistema de degradação das angiotensinas o angiotensinogênio é clivado pela renina, originando angiotensina I (Ang-I), esta será transformada em angiotensina II pela ECA, já a angiotensina II através das ações de AMP degradará a angiotensina III e esta será responsável pela liberação da vasopressina (Chappel, 2015; Bosso *et al.*, 2020). O componente responsável pela degradação da vasopressina é a CAP, que durante a infecção pelo ZIKV estava diminuída, podendo indicar um quadro hipertensivo na infecção após ZIKV. Esses dados corroboram com o estudo de Abdalla *et al.*, (2018) que observaram um paciente com crise hipertensiva (PA 240/120 mmHg) após ser

infectado pelo ZIKV, a pressão arterial permaneceu elevada mesmo após o início do tratamento (PA 238/120 mmHg). O desequilíbrio das angiotensinas também foi observado no estudo de Melo e colaboradores (2017) que avaliaram 79 pacientes divididos em controle e infectados. A angiotensina (Ang (1-7)) e Ang I foram reguladas positivamente após a infecção, mostrando uma tentativa de induzir autofagia das células infectadas (Melo *et al.*, 2017). Portanto, o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) pode desempenhar um papel importante na resposta imune à infecção pelo ZIKV. Ang (1-7) é responsável por ativar a via PI3K-AKT-mTOR (Giani *et al.*, 2007), ao mesmo tempo, NS4A e NS4B que são proteínas não estruturais no ZIKV, inibem a via de sinalização AKT-mTOR (Liang *et al.*, 2016). A sinalização por meio do SRA (Ang (1-7)) persiste devido à infecção viral e a modulação positiva de PI3K.

Até o momento, o mecanismo por trás desse desequilíbrio nos aspectos da coagulação, vasodilatação e hipertensão arterial, após infecção pelo ZIKV, ainda não estão bem elucidados, mas sabe-se que outros flavivírus, como DENV e YFV amarela, ocasionam alterações nos fatores de coagulação originando sangramentos e trombose venosa, como também disfunção vasodilatadora (Vasconcelos *et al.* 2003, Pesaro *et al.* 2003, Oliveira *et al.* 2018, Samarasekara & Munasinghe 2018, Ramacciotti *et al.* 2019, Yeung *et al.* 2020). Ainda, os dados encontrados na análise *in silico* apontam à forte correlação entre DCV e infecção pelo ZIKV, pois os genes envolvidos estão relacionados à doença cerebrovascular, acidente vascular isquêmico, cardiomiopatia hipertrófica e hipertensão pulmonar. Da lista de genes presentes no banco de dados MalaCards, cerca de 390 genes relacionados com DCVs foram encontrados no ZIKAVID, evidenciando a correlação entre a infecção pelo ZIKV e o surgimento de patologias no sistema cardiovascular.

Os resultados do estudo *in vivo* também mostram elevado estresse oxidativo no tecido cardíaco após infecção pelo ZIKV, e os dados apresentados no experimento *in silico* mostram a forte correlação da infecção do ZIKV com o desequilíbrio oxidativo no hospedeiro, onde as rotas metabólicas mais afetadas estão relacionadas com a resposta ao estresse oxidativo. Geralmente as infecções virais estimulam a produção de EROs e inibem os níveis de enzimas

enzimáticas (Almeida *et al.*, 2020), porém neste estudo foi observado um aumento significativo da SOD e GPx (enzimas antioxidantes) no tecido cardíaco infectado, Almeida *et al.* (2020) verificaram baixos níveis de enzimas antioxidantes no fígado e cérebro de camundongos infectados com o ZIKV de cepa brasileira. Porém, sabe-se que as alterações nos níveis de enzimas antioxidantes podem variar conforme o tipo de célula e tempo de infecção (Camini *et al.*, 2017), cabe ressaltar que até o momento o estresse oxidativo no tecido cardíaco durante a infecção por ZIKV ainda não foi explorado. Os dados aqui apresentados mostraram o aumento nos níveis de marcadores de estresse oxidativo e o recrutamento de enzimas antioxidantes para o sítio de infecção. Portanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os possíveis danos clínicos relacionados à produção de radicais livres no tecido cardíaco durante a infecção pelo ZIKV.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados neste trabalho podemos concluir que células cardíacas são suscetíveis e permissíveis à infecção pelo ZIKV, principalmente na linhagem de cardiomioblastos murinos, pois neles o vírus conclui seu ciclo replicativo com liberação de progênie viral e aumento de título em 48 hpi. Além disso, a infecção pelo ZIKV culminou em lise celular e maior produção de EROs em ambas as linhagens celulares.

Os animais imunocompetentes infectados apresentaram níveis elevados de marcador de injúria celular com ativação de enzimas pró-coagulantes e uma regulação negativa da fibrinólise, indicando um estado pró-trombótico nesses animais. Ainda, a infecção pelo ZIKV no tecido cardíaco provocou produção de ERO e aumento nos níveis das enzimas antioxidantes, e os dados obtidos pela análise *in silico* mostram a forte correlação da infecção pelo ZIKV no aumento de estresse oxidativo e no desenvolvimento de DCV. Assim, os resultados apresentados neste estudo mostram fortes evidências de que, além de ser um vírus neurotrópico, o ZIKV possui tropismo pelo tecido cardíaco.

Cabe ressaltar que este é o primeiro trabalho a evidenciar dano cardíaco na infecção por ZIKV em animais imunocompetentes, mostrando a importância de se investigar a patogênese do ZIKV em indivíduos saudáveis e a necessidade do desenvolvimento de mais estudos para melhor compreender os efeitos do vírus no tecido cardíaco. O alerta se torna mais emergente visto que recentemente foi lançado o alerta para um novo surto global de ZIKV a qualquer momento.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Verificar a expressão do receptor AXL nas linhagens celulares cardíacas e no tecido cardíaco durante a infecção pelo ZIKV. Posteriormente avaliar a infecção do ZIKV em animais espontaneamente hipertensos e normotensos com o objetivo de verificar se a infecção altera a pressão arterial sanguínea. Ainda, pretende-se avaliar a atividade da angiotensina II, ECA, CK-MB, calcineurina e estresse oxidativo desses animais.

8. REFERÊNCIAS

Abdalla LF, Santos JHA, Barreto RTJ, Souza EM, D'Assunção FF, Borges MA, *et al.* Atrial fibrillation in a patient with Zika virus infection. *Virol J.* 2018 Jan 25;15(1):23. doi: 10.1186/s12985-018-0938-2.

Aletti M, Lecoules S, Kanczuga V, Soler C, Maquart M, Simon F, Leparç-Goffart I. Transient myocarditis associated with acute Zika virus infection. *Clin Infect Dis.* 2017 Mar 1;64(5): 678-679. doi: 10.1093/cid/ciw802.

Almeida LT, Ferraz AC, Caetano CS, Menegatto MBS, Andrade ASP, *et al.* Zika vírus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities *in vitro* and *in vivo*. *Virus Res.* 2020 Sep;286:198084. Doi:10.1016/j.virusres.2020.108084.

Ambrocio AH, Soto-Acosta R, Tammineni ER, Carrillo ED, Bautista-Carbajal P, Hernández A, Sánchez JA, Angel RM. An embryonic heart cell line is susceptible to dengue virus infection. *Virus Res.* 2015 Feb 16;198:53-8. doi: 10.1016/j.virusres.2015.01.004.

Angelidou A, Michael Z, Hotz A, Friedman K, Emani S, LaRovere K, Christou H. Is there more to Zika? Complex cardiac disease in a case of congenital Zika syndrome. *Neonatology*. 2018; 113(2), 177-182. doi: 10.1159/000484656.

Arias-Arias JL, Vega-Aguilar F, Corrales-Aguilar E, Hun L, Loría GD, Mora-Rodríguez R. Dengue virus infection of primary human smooth muscle cells. *Am J Trop Med Hyg*. 2018 Dec;99(6):1451-1457. doi:10.4269/ajtmh.18-0175.

Arrais NMR, Souza PVS, Leite GCP, Bezerra MTAL, Maia CRS, Moraes-Pinto MI. Congenital heart disease in Zika virus congenital syndrome: How and when to investigate. *Acta Paediatr*. 2021 Dec;110(12):3343-3345. doi: 10.1111/apa.16063.

Bai C, Li S, Song S, *et al*. Zika virus induces myocardial immune response and myocarditis in mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2020 Nov;148:103-105. doi:10.1016/j.yjmcc.2020.08.014.Epub2020Sep6.

Barr KL, Anderson BD, Prakoso D, Long MT. Working with Zika and Usutu Viruses *In vitro*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Aug 19;10(8): e0004931. doi: 10.1371/journal.pntd.0004931.

Batlle M, Recarte-Pelz P, Roiq E, Castel MA, Cardona M, Farrero M, Ortiz JT, Campos B, Pulgarín MJ, Ramírez J, Pérez-Villa F, Garcia de Frutos P. *Int J Cardiol*. 2014 May 15;173(3):402-9. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.03.2016.

Bosso M, Thanaraj TA, Abu-Farha M, Alanbaei M, Abubaker J, All-Mulla F. The Two Faces of ACE2: The Role of ACE2 Receptor and Its Polymorphisms in Hypertension and COVID-19. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020 Jun 25;18:321-327. doi:10.1016/j.omtm.2020.06.017.

Brasil. Ministério da Saúde. Microcefalia. 20 Nov de 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/microcefalia-1>> Acesso em: 15 Set de 2022.

Brindley MA, Hunt CL, Kondratowicz AS, Bowman J, Sinn PL, McCray PB, Quinn K, Weller ML, Chiorini JA, Maury W. Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein. *Virology*. 2011 Jul 5;415(2):83-94. doi: 10.1016/j.virol.2011.04.002.

Caldentey G, García de Frutos P, Cristóbal H, Garabito M, Berruezo A, Bosch X, San Antonio R, Flores-Umanzor E, Perea RJ, De Caralt TM, Rodríguez J, Ortiz-Pérez J. Serum levels of Growth Arrest-Specific 6 protein and soluble AXL in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2019 Dec;8(8):708-716. doi: 10.1177/2048872617740833.

Camini FC, Caetano CCS, Almeida LT, Magalhães CLB. Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Arch Virol*. 2017 162:907-917. doi: 10.1007/s00705-016-3187-y.

Carta KAG, Mendoza I, Morr I, Misticchio F, Meza Y, Finizola V, *et al*. Myocarditis, heart failure and arrhythmias in patients with Zika. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Mar, 69(11_Supplement), 906.

Carvalho RG, Lourenço-de-Oliveira R, Braga IA. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 109:787–796. doi:10.1590/0074-0276140304.

Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, Sall AA, Musso D. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014 20:1085–1086.

Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*. 2015 Jan;29(1):17-24. doi:10.1016/j.blre.2014.09.003.

Chappel MC. Biochemical evaluation of the renin-angiotensin system: the good, bad, and, absolute? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 Jan 15;310(2):H137-52. doi:10.1152/ajpheart.00618.2015.

Chen A, Burr L, McGuckin. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in respiratory disease. *Clin Transl Immunology*. 2018 Jun 13;7(6):e1019. doi: 10.1002/cti2.1019.

Chen J, Yang Y, Yang Y, Zou P, Chen J, He Y, Shui S, Cui Y, Bai R, Liang Y, Hu Y, Jiang B, Lu L, Zhang X, Liu J, Xu J. AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signaling. *Nat Microbiol*. 2018 Mar;3(3):302-309. doi: 10.1038/s41564-017-0092-4.

Coelho GE. Challenges in the control of *Aedes aegypti*. *Rev Inst Med Trop*. 2012, Sao Paulo 54(Suppl 1):S13–S14.

Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, *et al*. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. 2016 Jun 9;534(7606):267–71. doi 10.1038/nature18296.

DeBerge M, Glinton K, Subramanian M, Wilsbacher LD, Rothlin CV, Tabas I, Thorp EB. Macrophage AXL receptor tyrosine kinase inflames the heart after reperfused myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2021 Mar 15;131(6):e139576. doi: 10.1172/JCI139576.

Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952 Sep;46 (5):509-520. doi: 10.1016/0035-9203(52)90042-4.

Di Cavalcanti D, Alves LV, Furtado GJ, Santos, CC, Feitosa FG, Ribeiro MC, *et al.* Echocardiographic findings in infants with presumed congenital Zika syndrome: Retrospective case series study. *PLoS one.* 2017; 12(4), e0175065. doi: 10.1371/journal.pone.0175065.eCollection 2017.

Dowall SD, Graham VA, Rayner E, Atkinson B, Hall G, Watson RJ, Bosworth A, Bonney LC, Kitchen S, Hewson R. A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 May 5;10(5):e0004658. doi: 10.1371/journal.pntd.0004658.

El Costa H, Gouilly J, Mansuy J-M, Chen Q, Levy C, *et al.* ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Sci Rep.* 2016 Oct 19;6:35296. doi: 10.1038/srep35296.

Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, Lanciotti RS, Tesh RB.. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis.* 2011 May; 17(5):880-2. doi:10.3201/eid1705.101939.

Frumence E, Roche M, Krejbich-Trotot P, El-Kalamouni C, Nativel B, Rondeau P, Missé D, Gadea G, Viranaicken W, Desprès P. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. *Virology.* 2016 Jun;493:217-26. doi: 10.1016/j.virol.2016.03.006.

Giani JF, Gironacci MM, Muñoz MC, Peña C, Turyn D, Dominici FP. Angiotensin-(1 7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart *in vivo*: role of the AT1 and Mas receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Aug;293(2):H1154-63. Doi: 10.1152/ajpheart.01395.2006.

Gladwyn-Ng I, Cordón-Barris L, Alfano C, Creppe C, Couderc T, Morelli G, Thelen N, America M, Bessiéres B. Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. *Nat Neurosci.* 2018 Jan;21(1):63-71. doi: 10.1038/s41593-017-0038-4. Epub 2017 Dec 11.

Glenn K. Researchers Sound Alarm Over Zika's Potentially Harmful Heart Effects - American College of Cardiology [Internet]. [cited 2017 Jun 11]. Available from: <http://www.acc.org/about-acc/press-releases/2017/03/09/13/25/researchers-sound-alarm-over-zikas-potentially-harmful-heart-effects>.

Govero J, Esakky P, Scheaffer SM, Fernandez E, Drury A, Platt DJ, Gorman MJ, Richner JM, Caine EA, Salazar V, Moley KH, Diamond MS. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature.* 2016 Dec 15;540(7633):438-442. doi: 10.1038/nature20556.

Gratton R, Agrelli A, Tricarico PM, Brandão L, Crovella S. Autophagy in Zika Virus Infection: A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar; 20(5): 1048. Published online 2019 Feb 28. doi: 10.3390/ijms20051048.

Guedes M. No Brasil, mais de 230 mil pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2021. 29 Set de 2021. Disponível em: <<https://www.cnnbrasil.com.br/saude/no-brasil-mais-de-230-mil-pessoas-morreram-por-doencas-cardiovasculares-em-2021/>> Acesso em: 02 Abr 2022.

Hammel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Talignani L, Thomas F, Cao-Lormeau VM, Choumet V, Briant L, Desprès P, Amara A, Yssel H, Missé D. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*. 2015 Sep;89(17): 8880-8896. doi: 10.1128/JVI.00354-15.

Hamid S, Rhaleb IA, Kassem KM, Rhaleb NE. Role of kinins in hypertension and heart failure. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 Oct 28;13(11):347. doi: 10.3390/ph13110347.

Hennessey M, Fischer M, Staples JE. 2016. Zika virus spreads to new areas - Region of the Americas, May 2015–January. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Jan 29;65(3):55-8. doi:10.15585/mmwr.mm6503e1.

Hastings AK, Hastings K, Uraki R, Hwang J, Gaitsch H, Dhaliwal K, Williamson E, Fikrig E. Loss of the TAM receptor Axl ameliorates severe Zika virus pathogenesis and reduces apoptosis in microglia. *iScience*. 2019 Mar 29;13:339-350. doi: 10.1016/j.isci.2019.03.003.

Herry CL, Soares HMF, Schuler-Faccini L, Frasch MG. Machine learning model on heart rate variability metrics identifies asymptomatic toddlers exposed to Zika virus during pregnancy. *Physiol Meas*. 2021 Jun 17;42(5). doi: 10.1088/1361-6579/ac010e.

Joob B, Wiwanitkit V. Cardiac problem because of Zika vírus infection: a possibility. *Anatol J Cardiol*. 2016 Jun; 16(6): 455-456. doi: 10.14744/AnatolJCardiol.2016.7140.

Himmelsbach K, Hildt E. Identification of various cell culture models for the study of Zika virus. *World J Virol*. 2018 Feb 12;7(1): 10-20. doi: 10.5501/wjv.v7.i1.10.

Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ*. 2016 Sep 1;94(9):675-686C. doi: 10.2471/BLT.16.171082.

Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Myle AQ, Shearer FM, *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*, *Elife*. 2015 Jun 30;4:e08347. doi: 10.7554/eLife.08347.

Krittanawong C, Zhang H, Sun T. Cardiovascular complications after Zika virus infection. *Int J Cardiol*. 2016 Oct 15;221:859. doi 10.1016/j.ijcard.2016.06.293.

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008 Aug;14(8):1232-9. doi; 10.3201/eid1408.080287.

Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo SS, Lee SA, *et al.* Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. *Cell Stem Cell*. 2016, 19, 663–671. doi:10.1016/j.stem.2016.07.019.

Li XF, Dong HL, Huang XY, Qiu YF, Wang HJ, Deng YQ, *et al.* Characterization of a 2016 clinical isolate of Zika virus in non-human primates. *EBioMedicine*. 2016; 12:170-177. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.09.022.

Li M, Ye J, Zhao G, Hong G, Hu H, Cao K, Wu Y, Lu Z. Gas6 attenuates lipopolysaccharide-induced TNF α expression and apoptosis in H9C2 cells through NF- κ B and MAPK inhibition via the Axl/PI3K/Akt pathway. *Int J Mol Med*. 2019 Sep; 44(3): 982-994. doi: 10.3892/ijmm.2019.4275.

Lin HH, Yip BS, Huang LM, Wu SC. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnol Adv*. Jan-Feb 2018;36(1)47-53. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.09.004.

Liu S, DeLalio LJ, Isakson BE, Wang TT. AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. *Circ Res*. 2016; 119(11): 1183-1189. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309866.

MacDonald PDM, Holden EW. Zika and Public Health: Understanding the Epidemiology and Information Environment. *Pediatrics*. 2018 Feb;141(Suppl 2):S137-S145. doi: 10.1542/peds.2017-2038B.

Magrini F, Shimizu M, Roberts N, Fouad FM, Tarazi RC, Zanchetti A. Converting-enzyme inhibition and coronary blood flow. *Circulation*. 1987 Jan;75(1 Pt 2):1168-74.

Marques JA, Mendoza I, Carta KG, Morr I, Meza Y, Flores VF, *et al.* Zika and heart failure: prior dengue may bring out the worst. *J Am Coll Cardiol*. 2018; 71(11 Supplement). doi: 10.1016/S0735-1097(18)21271-3.

McShane L, Tabas I, Lemke G, Kurowska-Stolarska M, Maffia P. TAM receptors in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2019 Jul 1;115(8):1286-1295. doi: 10.1093/cvr/cvz100.

Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, Le Charpentier T, Hafirassou ML, Zamborlini A, Cao-Lormeau VM, *et al.* Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Reports*. 2017; 18:324–333. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.045.

Melaragno MG, Wuthrich DA, Poppa V, Gill D, Lindner V, Berk BC, Corson MA. Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats. *Circ Res*. 1998 Oct 5;83(7):697-704. doi:10.1161/01.res.83.7.697.

Melo CFOR, Delafiori J, de Oliveira DN, Guerreiro TM, Esteves C Z, Lima EO, Pando-Robles V, Catharino RR, Zika-Unicamp Network. Serum Metabolic Alterations upon Zika Infection. *Front Microbiol*. 2017 Oct 10;8:1954. doi:10.3389/fmicb.2017.01954.

Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, Garber C, Noll M, Klein RS, Noguchi KK, Mysorekar IU, Diamond MS. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell*. 2016 May 19;165(5):1081-1091. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.008.

Miner JJ, Diamond MS. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe*. 2017 Feb 8;21(2):134-142. doi: 10.1016/j.chom.2017.01.004. PMID: 28182948; PMCID: PMC5328190.

Miranda MR & Lima LM. Marcadores bioquímicos do infarto agudo do miocárdio. *Rev Med Minas Gerais*. 2014 1;24:98-105.

Musso D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015 21:1887. doi:10.3201/eid2110.151125.

Musso D, Gubler DJ. Zika vírus. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Jul; 29(3): 487-524. doi: 10.1128/CMR.00072-15.

Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect*. 2014 20:O595–O596. doi:10.1111/1469-0691.12707.

Navinan MR, Yudhishdran J, Herath S, Liyanage I, Kugadas T, Kumara D, Kulatunga A. Complete heart block in dengue complicating management of shock due to both bleeding and leakage: a case report. *BMC Res Notes*. 2015 4;8:68. doi: 10.1186/s13104-015-1036-9.

Oliveira CS, Vasconcelos, PFC. Microcephaly and Zika virus. *J Pediatr (Rio J)*. 2016;92(2):103-105.

Oliveira GMM, Ferreira RM. Febre Amarela e Doença Cardiovascular: Uma Interseção de Epidemias. 2018.

Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain

abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016; Jan;47(1):6-7. doi: 10.1002/uog.15831.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde: Doenças cardiovasculares continuam sendo principal causa de morte nas Américas. 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/29-9-2021-doencas-cardiovasculares-continuam-sendo-principal-causa-morte-nas-americas> Acesso em: 14 Jan 2022.

Orofino DHG, Passos SRL, de Oliveira RVC, Farias CVB, Leite MFMP, *et al.* Cardiac findings in infants with in utero exposure to Zika virus-a cross sectional study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12(3):e0006362. doi: 10.1371/journal.pntd.0006362.

Paixão ES, Barreto F, Teixeira Mda G, Costa Mda C, Rodrigues LC. History, epidemiology, and clinical manifestations of Zika: a systematic review. *Am J Public Health.* 2016 Apr;106(4):606-12. doi: 10.2105/AJPH.2016.303112.

Pant A, Kopec AK, Luyendyk JP. Role of the blood coagulation cascade in hepatic fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2018 Aug1;315(2): G171-G176. doi: 10.1152/ajpgi.00402.2017.

Park KC, Gaze DC, Collinson PO, Marber MS. Cardiac troponins: from myocardial infarction to chronic disease. *Cardiovasc Res.* 2017 Dec 1;113(14):1708-1718. doi:10.1093/cvr/cvx183.

Pesaro AE, D'amico E, Aranha LFC. Dengue: cardiac manifestations and implications in antithrombotic treatment. 2007.

Rajahram GS, Hale G, Bhatnagar J, Hiu J, Thayan R, William T, *et al.* Postmortem evidence of disseminated Zika virus infection in an adult patient. *Int J Infect Dis.* 2019; 83:163-166. doi: 10.1016/j.ijid.2019.01.047.

Ramacciotti E, Agati LB, Aguiar VCR, Wolosker N, Guerra JC, de Almeida RP, Alves JC, Lopes RD, *et al.* Zika and Chikungunya virus and risk for venous thromboembolism. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2019; 25:1076029618821184. doi:10.1177/1076029618821184.

Relatório Anual de Gestão. Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. Relatório. 2020. Disponível em: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/202103/31140004-rag-2020-final-30032021.pdf>> Acesso em: 23 Jan 2022.

Richard AS, Shim B, Kwon Y, Zhang R, Otsuka Y, Schmitt K, Berri F, Diamond M, Choe H. AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Feb 21;114(8):2024-2029. doi: 10.1073/pnas.1620558114.

Roos RP. Zika Virus—A Public Health Emergency of International Concern. *JAMA Neurol.* 2016 Dec 1;73(12):1395–1396. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.3677.

Rossi F, Josey B, Sayitoglu EC, Potens R, Sultu T, Duru AD, Beljanski V. Characterization of Zika virus infection of human fetal cardiac mesenchymal stromal cells. *PLoS One.* 2020 Sep 17;15(9):e0239238. doi: 10.1371/journal.pone.0239238. eCollection 2020.

Ruocco NA, Bergelson BA, Yu TK, Gavras I, Gavras H. Augmentation of coronary blood flow by ACE inhibition: role of angiotensin and bradykinin. *Clin Exp Hypertens.* 1995 Oct; 17(7):1059-72. doi: 10.3109/10641969509033651.

Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR, *et al.* Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(3):238–42. doi: 10.1097/INF.0b013e3181bc3c5b.

Samarasekara K, Munasinghe J. Dengue shock syndrome complicated with acute liver failure and kidney injury, infective endocarditis, and deep vein thrombosis: a case report. *J Med Case Rep.* 2018 Oct 30;12(1):321. doi:10.1186/s13256-018-1862-1.

Silva-Filho JL, Oliveira LG, Monteiro L, Parise PL, Zanluqui NG, *et al.* Gas6 drives Zika virus-induced neurological complications in humans and congenital syndrome in immunocompetent mice. *Brain Behav Immun.* 2021 Oct; 97:260-274. doi: 10.1016/j.bbi.2021.08.008.

Subramaniam S, Scharrer I. Procoagulant activity during viral infections. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2018 Jan 1;23(6):1060-1081. doi: 10.2741/4633.

Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76(1):16–32. doi: 10.1128/MMBR.05015-11.

Triantafyllou K, Orthopoulos G, Vakakis E, Ahmed MAE, Golenbock DT, Lepper PM, *et al.* Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent. *Cell Microbiol.* 2005 Aug;7(8):1117–26. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00537.x.

Vasconcelos PFC. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

Xie S, Zhang H, Liang Z, Yang X, Cao R. AXL, an important host factor for DENV and ZIKV replication. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Mar 22;11:575346. doi: 10.3389/fcimb.2021.575346.

Waggoner JJ, Roupheal N, Xu Y, Natrajan M, Lai L, Patel SM, *et al.* Pericarditis associated with acute Zika virus infection in a returning traveler. *Open Forum Infect Dis.* 2017 May 18;4(2):ofx103. doi: 10.1093/ofid/ofx103.

Whang ZY, Wang Z, Zhen ZD, Feng KH, Guo J, Gao N, Fan DY, Han DS, Wang PG, An J. Axl is not an indispensable factor for Zika virus infection in mice. *J Gen Virol*. 2017 Aug;98(8):2061-2068. doi:10.1099/jgv.0.000886.

Wells MF, Salick MR, Wiskow O, Ho DJ, Worringer KA, Ihry RJ, Kommineni S, Bilican B, Klim JR, Hill EJ, Kane LT, Ye C, Kaykas A, Eggan K. Genetic ablation of AXL does not protect human neural progenitor cells and cerebral organoids from Zika virus infection. *Cell Stem Cell*. 2016 Dec 1;19(6):703-708. doi: 10.1016/j.stem.2016.11.011.

Wu M, Lu S, Zhong J, Huang K, Zhang S. Protective Effects of Pterostilbene Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Inflammation*. 2017 Apr; 40(2):578-588. doi: 10.1007/s10753-016-0504-2.

Yeung W, Lye DCB, Thein TL, Chen Y, Leo YS. Blood pressure trend in hospitalized adult dengue patients. *PLoS One*. 2020 Jul 1;15(7):e0235166. doi:10.1371/journal.pone.0235166.eCollection 2020.

Zhang Z, Rong L, LI YP. Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019, 1–17. 2019, 1–17. doi.org/10.1155/2019/1409582.