

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

**Fundação Oswaldo Cruz**



**ICTB  
MPCAL**



**ICTB**  
Instituto de Ciência e  
Tecnologia em Biomodelos

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM ANIMAIS DE  
LABORATÓRIO

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM BIOMODELOS

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Marcia Soraya Carreteiro de Oliveira

**Avaliação dos sinais clínicos de modelo murino Swiss webster neonato  
infectados pelo vírus da Zika**

Rio de Janeiro

2018

Marcia Soraya Carreteiro de Oliveira

**Avaliação do modelo murino Swiss webster neonato na infecção pelo Vírus da Zika (ZIKV), através de aspectos patogênicos**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – FIOCRUZ

Orientador (a): Dr.<sup>a</sup> Luciene Paschoal Braga Dias

Co-orientador (a): Dr.<sup>a</sup> Loraine Campanati

Rio de Janeiro

2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Marcia .

Avaliação dos sinais clínicos de modelo murino Swiss Webster neonato infectados pelo vírus da Zika / Marcia Oliveira. - Rio de Janeiro, 2018.  
61 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, Pós-Graduação em Ciência em Animais de Laboratório, 2018.

Orientadora: Luciene Paschoal Braga Dias.

Co-orientadora: Loraine Campanatti.

Bibliografia: f. 55-60

1. Camundongos. 2. Zika vírus. 3. Modelo Animal. 4. Infecção Viral. 5. Patogênese. I. Título.

Marcia Soraya Carreteiro de Oliveira

**Avaliação do modelo murino Swiss webster neonato na infecção pelo Vírus da Zika (ZIKV), através de aspectos patogênicos**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Animais de Laboratório, Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos – FIOCRUZ

Aprovada em 22 de fevereiro de 2018.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabella de Moura Folhadella Pires  
Fundação Oswaldo Cruz  
(Presidente da Banca)

---

Dr. Fábio Jorge Moreira da Silva  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Rafael Brandão Varela  
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro  
2018

***Ao meu pai** que sempre apontou a leitura, a curiosidade e a busca do conhecimento como os únicos caminhos viáveis para a construção de uma vida mais plena. Que me deixa a maior das heranças... Educação. Gratidão eterna meu amado pai.*

## AGRADECIMENTOS

Aos **animais** que participaram desse trabalho com suas vidas, meu respeito e gratidão.

Às orientadoras **Dr.<sup>a</sup> Luciene Paschoal Braga Dias** e **Dr.<sup>a</sup> Loraine Campanati** pela valiosa orientação e conhecimentos compartilhados e cujo amor pela ciência me inspiram a melhorar sempre. Obrigada por estarem ao meu lado e embarcarem comigo na ambição de ingressar em um curso de mestrado. A amiga e grande profissional **Lu** reservo um especial agradecimento, pelo acompanhamento competente, por apoiar decisões importantes em minha carreira acadêmica e por me ensinar a ser uma profissional engajada na formação crítica de novas ideias.

Ao **Fábio Lima Monteiro**, companheiro de projeto com quem dividi não só dados e resultados, mas também aflições e conquistas. Jamais teria conseguido sem você.

À **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosany Bochner** pelo dom de traduzir números em palavras. Pelo carinho e disponibilidade.

Ao **Prof. Dr. Amilcar Tanuri** por ceder as cepas virais, mas principalmente por ter esse espírito agregador, onde acabamos todos juntos e misturados.

À **Fiocruz**, orgulho de ser!

À coordenação, corpo docente e administrativo do **MPCAL**, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação acadêmica, profissional e científica, em especial à **Fátima Pereira Fernandes** pelos melhores abraços nos piores momentos.

Aos colegas do **ICTB**, principalmente aos do **SCQA** que sempre souberam compreender minha ausência e ocupações permanentes ao longo desses dois anos, sobretudo à **Aline Araújo**, **Aline Cardoso** e **Mariana Antunes** por sempre estarem prontas para ajudar em toda e qualquer circunstância, à **Ricardo dos Santos** e **Thainara Pinto** pela parceria e comprometimento e à **Cleber Hooper**, pela amizade e confiança.

À todos do **SBDA** por me receberem em todos os momentos, sempre com sorrisos, palavras encorajadoras e muito profissionalismo.

Aos **colegas** e **amigos da turma 01.2016** de mestrado, pelas angústias e alegrias compartilhadas.

Aos membros da Banca de Qualificação, **Dr.<sup>a</sup> Janaína Barcelos Porto Ferreira**, **Dr. Luíz Ricardo Berbert**, **Dr. Fábio Jorge da Silva** e **Dr. Désio Aurélio Farias de Oliveira**, agradeço pelas suas preciosas considerações e generosas sugestões de aprimoramento.

Agradeço aos professores participantes da banca examinadora **Dr.<sup>a</sup> Isabella Folhadella, Dr. Rafael Brandão Varella, Dr.<sup>a</sup> Janaína Barcellos Porto Ferreira, Dr.<sup>a</sup> Daiane Cristina Ferreira Golbert e Dr. Fábio Jorge da Silva** que dividem comigo este momento tão importante e esperado. Em especial a **Dr.<sup>a</sup> Isabella** por ter se dedicado a revisão da dissertação com tanto zelo e dedicação, me mostrando de perto a arte da pesquisa.

Minhas filhas **Brunna e Bianca**, fontes permanentes de bem querer que preenchem espaço e tempo, em um cotidiano de cumplicidade e partilha amorosa.

**Mãe**, obrigada por me ensinar a não desistir dos meus sonhos, por acreditar em mim e por compartilhar das minhas angústias e conquistas. Sua memória é exemplo de força-guerreira e renascer constante. Agradeço a você por ter sido minha mãe. Te amo muito e sempre! (*in memoriam*).

Aos meus irmãos **Egina, Marcio e Adriana**, que, com todo carinho e amor nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Que aplaudem, sustentam e incentivam meu Caminho, obrigada por fortalecerem meus passos!

Aos sobrinhos **Thaís, Théo, Yazmim e Ana**, mesmo distante eu sinto o amor e apoio, e nunca estou sozinha porque vocês estão dentro do meu coração.

Aos amigos de todo sempre, **Marthinha, Augusto, Kell e Adriano**, porque ao lado deles, as loucuras são perdoadas, as alegrias mais intensas e as tristezas passageiras.

Às amigas de uma vida inteira, **Gabi, Jê, Mônica e Rita**, por todos os nossos preciosos encontros ao longo desses 30 anos, por me amarem e me incentivarem incansavelmente.

**Erica e Felipe Dumans** por me acolherem nos melhores e piores momentos. Meus grandes amigos de ombros pacientes, ouvidos atentos e abraços sempre calorosos.

**Dimitrius Borja e Gilberto Moura**, fundamentais para meu equilíbrio físico e emocional nessa etapa da vida, quando foi necessário desconectar do todo e reconectar a mim mesma.

**Marcelo Tutungi Pereira**, pelas *infinitudes*...

**Dai, Lu, Bruno e Tuza**, por tornarem a bagagem mais leve, os passos mais firmes e as paisagens mais belas.

**Cris, Rê, Dudu, Fê, Eric, Bela, Raquel, Binho, Berê e Mari**, agradeço à todos vocês por compartilharem a vida comigo e assim lhe darem um significado.

*"Só um sentido de invenção e uma necessidade intensa de criar levam o homem a revoltar-se, a descobrir e a descobrir-se com lucidez."*

*Pablo Picasso*

## RESUMO

No Brasil, em 2016, o vírus da Zika se tornou um problema de saúde pública, pelo aumento vertiginoso no número de infectados. A patogênese causada pela infecção das cepas circulantes é pouco caracterizada e investigam-se mudanças na virulência, visto que, complicações neurológicas foram constatadas, como a síndrome de Guillain-Barré e a microcefalia. O uso de modelos animais para estudar a dinâmica da infecção pelo ZIKV é extremamente valioso. Camundongos neonatos heterogênicos são susceptíveis à infecção pelo ZIKV, no entanto, não se sabe como o modelo se comporta no desenvolvimento de testes pré-clínicos de compostos com atividade antiviral. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a dinâmica comportamental do vírus da Zika. Para determinar a concentração ideal para o estudo dos aspectos patológicos, camundongos (*Mus musculus*, Swiss webster) neonatos com 3 dias de vida, foram inoculados intraperitonealmente com quatro diferentes concentrações ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  PFU) das cepas asiáticas (AB e PE) e da cepa africana (MR766) do vírus Zika. O grupo 1 foi constituído de neonatos inoculados com a cepa MR766 e controle (MOCK), o grupo 2 com a cepa AB e controle (MOCK) e o grupo 3 com a cepa PE e controle. Foram determinadas as curvas de peso e de sobrevivência, assim como a presença de sinais clínicos. Os dados foram analisados por teste estatístico *Two Way* ANOVA. As concentrações de  $10^5$  e  $10^6$  PFU de todas as cepas estudadas promoveram uma perda de peso significativa ( $p < 0,001$ ) nos animais, quando comparados ao grupo controle e os grupos inoculados com  $10^3$  e  $10^4$  PFU, mas não apresentaram perda de peso significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparados entre si. Todos os animais inoculados com a cepa MR766 foram a óbito, independente da concentração utilizada. No grupo inoculado com a cepa AB, os animais que receberam as menores concentrações apresentaram taxa de sobrevivência superior a 75%, enquanto os desafiados com as maiores concentrações foram a óbito. A cepa PE não promoveu óbitos nos animais inoculados com a concentração de  $10^3$  PFU, enquanto os inoculados com  $10^4$  e  $10^5$  PFU apresentaram taxa de sobrevivência de 80%, e os inoculados com a maior concentração foram a óbito. As três diferentes cepas (MR766, AB e PE) apresentaram sinais clínicos da infecção condizentes com características neurotrópicas para a espécie. Em conclusão, os animais infectados com as três cepas na concentração de  $10^4$  PFU apresentaram sinais clínicos, taxa de sobrevivência e curva de peso que caracterizaram a infecção viral pelo ZIKV, permitindo que essa concentração de partículas virais seja usada para observação clínica em longo prazo em camundongos da linhagem Swiss webster, enquanto que a concentração de  $10^5$  PFU parece ser mais eficaz à aplicação de ensaios com fármacos, visto que os animais desenvolvem a doença de forma aguda.

**Palavras chave: Camundongos; Vírus da Zika; Modelo animal; Infecção viral; Patogênese.**

## ABSTRACT

In Brazil, in 2016, the Zika virus became a public health problem, since the number of infected had a vertiginous increase. The pathogenesis caused by infection of circulating strains is poorly characterized and we investigate whether there were changes in virulence, since neurological complications were observed, such as Guillain-Barré syndrome and microcephaly. The use of animal models to study the dynamics of ZIKV infection is extremely valuable. Heterogenic neonatal mice are susceptible to ZIKV infection, however, it is not known how the model behaves in the development of preclinical assays of compounds with antiviral activity. In this context, the present work aimed to evaluate the behavioral dynamics of the Zika virus. In order to determine the ideal concentration for the study of pathological aspects, 3-day-old neonatal mice (*Mus musculus*, Swiss webster) were inoculated intraperitoneally with four different concentrations ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  PFU) of Asian strains (AB and PE) and the Zika virus African strain (MR766). Group 1 was composed of infants inoculated with strain MR766 and control (MOCK), group 2 with strain AB and control (MOCK) and group 3 with strain PE and control. Weight and survival curves were determined as well as the presence of clinical signs. Assays were analyzed by Two Way ANOVA statistical test. The concentrations of  $10^5$  and  $10^6$  PFU of all strains studied promoted significant weight loss ( $p < 0.001$ ) in the animals, when compared to the control group and the groups inoculated with  $10^3$  and  $10^4$  PFU, but did not present significant weight loss ( $p > 0.05$ ) when compared to each other. All animals inoculated with MR766 strain died, regardless of the concentration used. Of the groups inoculated with the AB strain, the animals that received the lowest concentrations presented survival rates higher than 75%, while those challenged with the highest concentrations were all dead. The PE strain did not promote deaths in the group inoculated with the concentration of  $10^3$  PFU, while the  $10^4$  and  $10^5$  PFU groups showed a survival rate of 80% and the animals inoculated with the highest concentration were all dead. The three different strains (MR766, AB and PE) presented clinical signs of infection consistent with neurotropic characteristics for the species. In conclusion, the animals infected with the three strains in the concentration of  $10^4$  PFU showed clinical signs, survival rate and weight curve that characterized the viral infection by ZIKV, allowing this concentration of viral particles to be used for long-term clinical observation in mice of the Swiss webster line, whereas the concentration of  $10^5$  PFU appears to be more effective in the application of drug assays, since the animals develop the chronic disease.

**Keywords:** Mouse; Zika virus; Animal model; Viral infection; Pathogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Disseminação do Vírus da Zika no mundo.	16
Figura 2: Filogenia de cepas do Vírus da Zika	22
Figura 3: Grupos experimentais - esquema. Contendo as três cepas virais e as quatro concentrações utilizadas	31
Figura 4: Gráficos das curvas de peso dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Africana do Vírus da Zika (MR766)	36
Figura 5: Animais inoculados com a cepa MR766 - 6dpi.	37
Figura 6: Gráficos das curvas de peso dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Asiática do Vírus da Zika (AB)	38
Figura 7: Animais inoculados com a cepa AB – 21dpi	39
Figura 8: Gráficos das curvas de peso dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Asiática do Vírus da Zika (PE).	40
Figura 9: Animal inoculado com a cepa PE - 14dpi.	41
Figura 10: Gráficos de taxa de sobrevivência dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Africana do Vírus da Zika (MR766).	41
Figura 11: Gráficos de taxa de sobrevivência dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Asiática do Vírus da Zika (AB).	42
Figura 12: Gráficos de taxa de sobrevivência dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Asiática do Vírus da Zika (PE)	43
Figura 13: Gráfico de sinais clínicos dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Africana do Vírus da Zika (MR766).	44
Figura 14: Gráfico de sinais clínicos dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Asiática do Vírus da Zika (AB).	45
Figura 15: Gráfico de sinais clínicos dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Asiática do Vírus da Zika (PE).	46
Figura 16: Gráfico de replicação viral das 3 cepas de Vírus da Zika	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos Experimentais

32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**BR** - Cepa Asiática do Vírus da Zika isolada no estado do Espírito Santo/Brasil

**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais

**CONCEA** - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

**DENV** - Vírus da Dengue

**dpi** - Dias pós-infecção

p3 – Pós nato 3 dias

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**GBS** - Síndrome de Guillain-Barré

**IFN** - Interferon

**JEV** - Vírus da Encefalite Japonesa

**MR766** - Cepa Africana do Vírus da Zika

**NPCs** - Células precursoras neurais

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**OPAS** - Organização Pan-Americana de Saúde

**PE** - Cepa Asiática do Vírus da Zika isolada do estado de Pernambuco/Brasil

**PFU** - Unidades Formadoras de Placas (Plaque forming units Unidades)

**RNA** - Ácido ribonucleico

**SFB** - Soro Fetal Bovino

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**UR** - Umidade Relativa

**ZIKV** - Vírus da Zika

**ZIKVBR** - cepa do Vírus da Zika isolado do Brasil

**WT** - Wild Type

**YFV** - Vírus da Febre Amarela

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 A origem e epidemiologia do Vírus da Zika	19
2.2 Análises genômicas de cepas de ZIKV	21
2.3 Sintomatologia Clínica do ZIKV em Humanos	23
2.4 Modelo Animal para estudo do ZIKV	24
3. JUSTIFICATIVA	27
4. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo Geral	29
4.2 Objetivos Específicos	29
5. MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1 Animais experimentais e licenças	30
5.2 Determinação dos grupos experimentais	31
5.3 Obtenção das cepas virais propagação e titulação de ZIKV	32
5.4 Inoculação dos neonatos Swiss webster	33
5.5 Avaliação dos neonatos pós infecção (sinais clínicos, curva de peso e taxa de sobrevivência dos animais infectados)	33
5.6 Coleta dos tecidos para confirmação da infecção viral através do ensaio de placa de lise	34
5.7 Análise dos resultados	34
6. RESULTADOS	35
6.1 Curva de peso dos neonatos	35
6.1.1 Animais inoculados com a cepa Africana do vírus Zika (MR766)	35
6.1.2 Animais inoculados com a cepa Asiática do vírus Zika (AB)	37
6.1.3 Animais inoculados com a cepa Asiática do Vírus da Zika (PE)	39
6.2. Taxa de sobrevivência dos neonatos infectados	41
6.2.1 Animais inoculados com a cepa Africana do Vírus da Zika (MR766)	41
6.2.2 Animais inoculados com a cepa Asiática do Vírus da Zika (AB)	42
6.2.3 Animais inoculados com a cepa Asiática do Vírus da Zika (PE)	42
6.3 Sinais clínicos	43
6.3.1 Animais inoculados com a cepa Africana do Vírus da Zika (MR766)	43

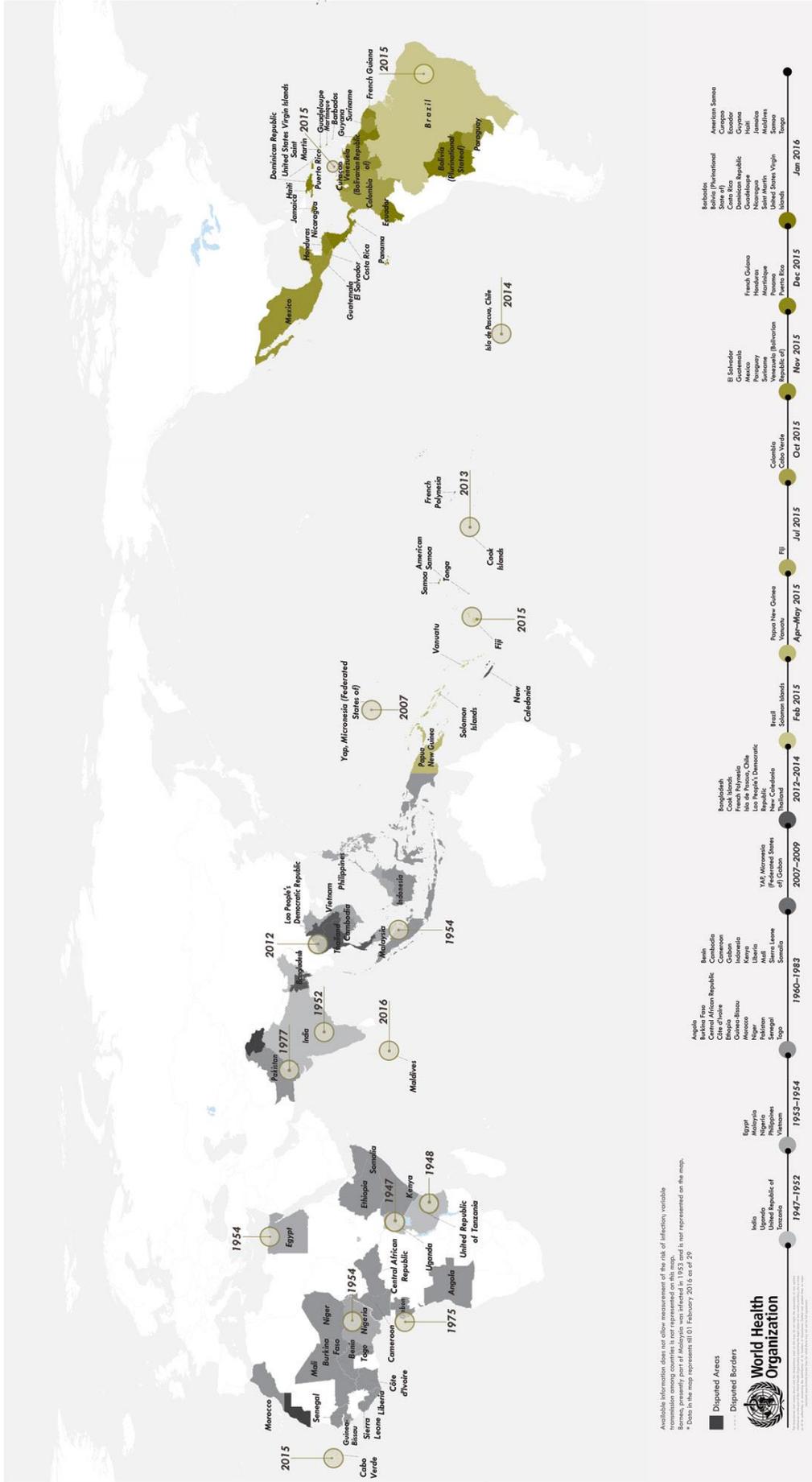
6.3.2 Animais inoculados com a cepa Asiática do Vírus da Zika (AB)	44
6.3.3 Animais inoculados com a cepa Asiática do Vírus da Zika (PE)	45
6.4 Confirmação da presença do ZIKV nos tecidos cerebrais	46
7. DISCUSSÃO	48
8. CONCLUSÕES	54
9. REFERÊNCIAS	55
ANEXO 1	60
Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	60

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) e foi descrito pela primeira vez em 1947 em Uganda, a partir da análise do sangue de macacos *Rhesus* sentinelas para a Febre Amarela (DICK, 1952). Após o isolamento, a infecção em humanos foi descrita pela primeira vez na Nigéria, em 1954 (MACNAMARA, 1954). Desde então, o vírus se espalhou da África para a Ásia (FAYE et al, 2014). Entre o início da década de 1950 a 1980, uma quantidade crescente de evidências apontou para doenças humanas associadas à transmissão de ZIKV (SIKKA, 2016). Embora tenham passado mais de 60 anos desde a descoberta do vírus, apenas um pequeno número (<10) dos casos humanos foi encontrado na literatura ao longo dos últimos 10 anos (ŞAHINER, 2016). Em 2007, a primeira transmissão do vírus Zika em pessoas fora da África e da Ásia foi relatada. Ocorreu no Estado Yap, na Micronésia Francesa, onde 49 pessoas apresentaram infecção pelo vírus Zika confirmadas através da combinação de análise genética e sorológica (WIKAN, 2016). Estima que 73% da população de Yap com mais de três anos de idade tenha sido infectada pelo vírus naquela época (KINDHAUSER, 2016).

Foram identificadas duas linhagens geograficamente distintas do vírus, africano e asiático, bem como múltiplas estirpes dentro de cada linhagem. A análise de amostras virais do Estado de Yap reforçou evidências epidemiológicas anteriores de que o surto se originou no sudeste da Ásia (DUFFY, 2009). Essa epidemia em 2007, provavelmente foi resultado da introdução de uma ou mais cepas de ZIKV do Sudeste Asiático, apontando para uma expansão da linhagem asiática (HADDOW, 2012). Desde então, infecções por vírus Zika foram relatadas em todo o mundo, inclusive na Polinésia Francesa e outras ilhas no Oceano Pacífico; e regiões da América do Sul, Central e do Norte (WIKAN, 2016) (**Figura 1**).

Cepas do vírus da linhagem asiática causaram surtos da doença na Polinésia Francesa entre 2013 e 2014 (CAO-LORMEAU et al, 2016). Essa linhagem expandiu-se rapidamente e muitos casos foram relatados a partir de Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa, no Chile (SLAVOV et al, 2016). Casos esporádicos de infecção pelo vírus Zika foram relatados em vários países do sudeste asiático entre 2010 e 2015 (**Figura 1**).



Fonte: WHO-World Health Organization

**Figura 1: Disseminação do Vírus da Zika no mundo.** Descrito pela primeira vez em 1947 em Uganda a partir da análise do sangue de macacos *Rhesus* sentinelas. Após o isolamento do Vírus da Zika, a infecção em humanos foi descrita pela primeira vez na Nigéria, em 1954. Desde então, o vírus se espalhou a partir de África para a Ásia. Cepas do vírus da linhagem asiática causaram surtos da doença na Micronésia em 2007 e na Polinésia Francesa entre 2013 e 2014. A linhagem asiática expandiu-se rapidamente e muitos casos foram relatados a partir de Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa, no Chile. Em 15 de maio de 2015, confirmou-se a presença do vírus Zika no Brasil, conforme nota divulgada pelo Ministério da Saúde.

Em 15 de maio de 2015, confirmou-se a presença do ZIKV no Brasil, conforme nota divulgada pelo Ministério da Saúde (FANTINATO et al, 2016). O número de infectados pelo vírus no Brasil, América Central e Caribe, teve um aumento vertiginoso entre 2015 e 2016. Recentemente, o vírus foi encontrado em placentas humanas (QUICKE, et al., 2016) e no tecido cerebral de fetos diagnosticados com microcefalia (BRASIL et al., 2016; MARTINES et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; OLIVEIRA MELO et al., 2016; CULJAT et al., 2016). A infecção materna por ZIKV durante a gravidez foi associada a malformações neonatais, resultando em vários graus de anormalidades congênitas, microcefalia e até mesmo aborto (YUN, 2017).

Embora, na maioria dos casos, a infecção por ZIKV cause apenas sintomas leves em alguns indivíduos, está associada a uma série de distúrbios neuroimunológicos, incluindo síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalite e mielite (YUN, 2017). Foi observado um aumento no número de casos da síndrome de Guillain-Barré e meningoencefalite em pacientes que mostraram os sintomas de infecção pelo vírus (CAO-LORMEAU et al., 2016; CARTEAUX et al., 2016). Esta infecção pode ainda estar relacionada a danos oculares (VENTURA et al, 2016).

Diante desse cenário, o ZIKV se tornou um problema de saúde pública, e a patogênese causada pela infecção das cepas circulantes ainda é pouco caracterizada. Essa problemática está atrelada à dificuldade de execução de pesquisas com seres humanos, que é regida por legislações que protegem os indivíduos. Como no estudo de diversas outras doenças causadas por vírus, a utilização de modelos animais em pesquisa é a alternativa mais viável.

A pesquisa em modelos animais é uma ferramenta indispensável para o estudo de infecções por patógenos virais. A geração de conhecimentos a respeito da dinâmica de infecção, sintomatologia, padrão de mortalidade, patogenia e outros parâmetros é de extrema importância para profissionais de diversas áreas. Dados obtidos utilizando-se modelos animais contribuem para o avanço da ciência básica e aplicada.

No enfrentamento de uma epidemia, é importante a geração rápida de dados a respeito dos aspectos clínicos da doença em questão. Porém, poucos estudos *in vivo* foram realizados para caracterizar a patogênese causada pela infecção pelas cepas do ZIKV circulantes no Brasil. Embora o vírus Zika tenha uma das distribuições geográficas disseminadas mais antigas e melhor documentadas entre os arbovírus,

muitas questões continuam sem resposta sobre sua evolução, ecologia e epidemiologia (HADDOW, 2012).

Segundo Dick et al. (1952), camundongos neonatos são susceptíveis à infecção viral na primeira semana de vida, sugerindo que este seja um bom modelo animal para o estudo da doença. Nesta linha, o presente projeto propôs utilizar camundongos neonatos com 3 dias de vida, desafiados com as cepas isoladas de pacientes brasileiros AB e PE (linhagem asiática) e a cepa MR766 (linhagem africana), como modelo de estudo da patogênese causada pela infecção pelo vírus Zika.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Origem e epidemiologia do Vírus da Zika

O ZIKV é um arbovírus membro do gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, que também inclui o vírus da Dengue (DENV), o vírus da febre do Nilo Ocidental (WNV), o vírus da febre Amarela (YFV) e o vírus da Encefalite Japonesa (JEV) (BESNARD et al., 2014). ZIKV e DENV são transmitidos, principalmente, através das picadas de mosquitos da espécie *Aedes* infectados. Embora a transmissão de ZIKV ocorra predominantemente através de mosquitos, outros modos de transmissão também já foram relatados, incluindo transfusão sanguínea e relações sexuais (SIKKA, 2016). A primeira ocorrência relatada de transmissão por via sexual foi de um homem infectado por um parceiro masculino (DECKARD et al., 2016), e mais recentemente, de uma mulher infectada por um parceiro masculino (DAVIDSON et al., 2016).

Não obstante, a infecção pelo ZIKV foi relacionada à ocorrência de manifestações neurológicas. Na Micronésia, durante um surto de ZIKV em 2007, foram diagnosticados 40 casos de Síndrome de Guillain-Barré (GBS), representando uma incidência 20 vezes superior à do período precedente, do mesmo modo, situação semelhante foi identificada na Polinésia Francesa, em 2013 (MALTA, 2017).

As primeiras complicações neurológicas possivelmente associadas ao surto de ZIKV no Brasil foram relatadas em julho 2015, quando as autoridades sanitárias notificaram o Ministério da Saúde sobre um aumento no número de casos da GBS no estado da Bahia, no Nordeste do Brasil (BAHIA, 2015). Até fevereiro de 2017, 11 países notificaram aumento nos casos de GBS, e em alguns países da região das Américas, manteve-se o aumento observado nos casos de SGB no contexto da circulação do ZIKV (OPAS/OMS, 2017). A GBS é uma neuropatia autoimune, parálitica aguda, que pode se manifestar após uma infecção viral e que tem como alvo os nervos periféricos (WILLISON; JACOBS; VAN DOORN, 2016).

Embora a patogênese e fatores de risco associados ainda não tenham sido estabelecidos, está sendo investigado se as cepas de ZIKV mudaram em virulência ou se possíveis complicações, como GBS e microcefalia, foram despercebidas no passado, já que o número absoluto de infectados foi relativamente baixo. Certamente, estudos adicionais, modelos epidemiológicos e animais, são necessários para

estabelecer a possível associação entre a infecção por ZIKV e essas complicações (GOEIJENBIER, 2016).

Um aumento de hospitalizações devido à GBS, foi observado na região nordeste do Brasil, após o início da circulação do vírus Zika no país, quando comparado a períodos antes da epidemia de ZIKV (BARCELLOS et al., 2016).

Concomitantemente, um estudo avaliou o número de casos de encefalopatias em hospitalizações em diferentes regiões do Brasil mostrando que entre o segundo semestre de 2014 e 2015 os casos de neuropatias como: encefalites, mielites e encefalomielites, aumentaram cerca de duas vezes em relação aos anos anteriores, quando o ZIKV não circulava no país (BARCELLOS et al., 2016).

Há evidências de que a ZIKV possa ser transmitido de mãe para filho (infecção transplacentária) (BESNARD et al., 2014). Em outubro de 2015, foi relatado um aumento no número de crianças nascidas com microcefalia no estado de Pernambuco, com posterior notificação à OMS (BRASIL, 2016). Menos de um ano após o surto de ZIKV no Brasil, casos de alterações congênitas e principalmente, de microcefalia em fetos e recém-nascidos associados ao ZIKV começaram a ser notificados ao Ministério da Saúde. Foram cerca de 4000 recém-nascidos com microcefalia, presumivelmente associada a infecção por ZIKV (SIKKA, 2016). Foram descritas, também, alterações na visão de bebês infectados com o ZIKV, como atrofia coriorretiniana, mas pouco se sabe acerca dos mecanismos envolvidos, ou se as alterações observadas seriam reversíveis (DE PAULA FREITAS et al., 2016).

Segundo o relatório de novembro de 2016 da OMS, 26 países ou territórios reportaram casos de microcefalia ou anomalias associadas ao SNC associadas à infecção por ZIKV, enquanto 19 países ou territórios relataram aumento no número de casos de GBS ou confirmação de diagnóstico de ZIKV em pacientes com GBS (WHO, 2016). Estas condições neurológicas com outras mais raras sugerem que o vírus Zika, semelhante a outros *flavivírus*, seja neuropatogênico (ARAUJO, 2016).

Em 1 de fevereiro de 2016, a OMS declarou a epidemia do vírus Zika no Brasil como emergência de saúde pública de interesse internacional, em decorrência da associação da infecção com o aumento no número de casos de microcefalia e outras alterações neurológicas (WHO, 2016).

Até 15 de abril de 2017, foram registrados 7.911 casos de febre zika em todo o país, uma redução de 95,3% em relação a 2016, quando ocorreram 170.535

notificações (OPAS/OMS, 2017). O relato do surgimento de novos casos de microcefalia tem apresentado redução importante desde maio de 2016. Durante os 18 meses da emergência em saúde pública internacional houve um fortalecimento da capacidade de resposta nacional e local, por meio da colaboração entre as três esferas de gestão do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2017).

Portanto, em maio de 2017, o Ministério da Saúde declarou fim da Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN). A decisão, informada à Organização Mundial da Saúde (OMS) por meio de nova avaliação de risco, ocorreu 18 meses após a decretação de emergência, em um momento de queda nos casos de Zika e microcefalia em todo o país (BRASIL, 2017).

Apesar dessa notável queda nos relatos de febre da Zika e síndromes associadas, considera-se fundamental que os países continuem os esforços para reduzir ainda mais a dispersão da doença por meio de uma estratégia eficaz de controle do vetor e de esclarecimento à população.

## **2.2 Epidemiologia das cepas de ZIKV**

A evolução molecular do ZIKV no século 20 foi estudada usando a análise de seqüência do Zika obtida de mosquitos, seres humanos e outros mamíferos na África (SIKKA, 2016). Foram identificadas duas linhagens principais: a africana e a asiática. A primeira ainda não disseminada fora da África. As cepas ZIKV que circulam nas Américas são da linhagem asiática, com 99,9% de identidade com as cepas ZIKV que circularam na Polinésia Francesa em 2013-2014 (CALVET, 2016). A posição basal da cepa ZIKV isolada na Malásia em 1966 sugere que o surto na Micronésia foi iniciado por uma cepa do Sudeste Asiático (HADDOW, 2012).

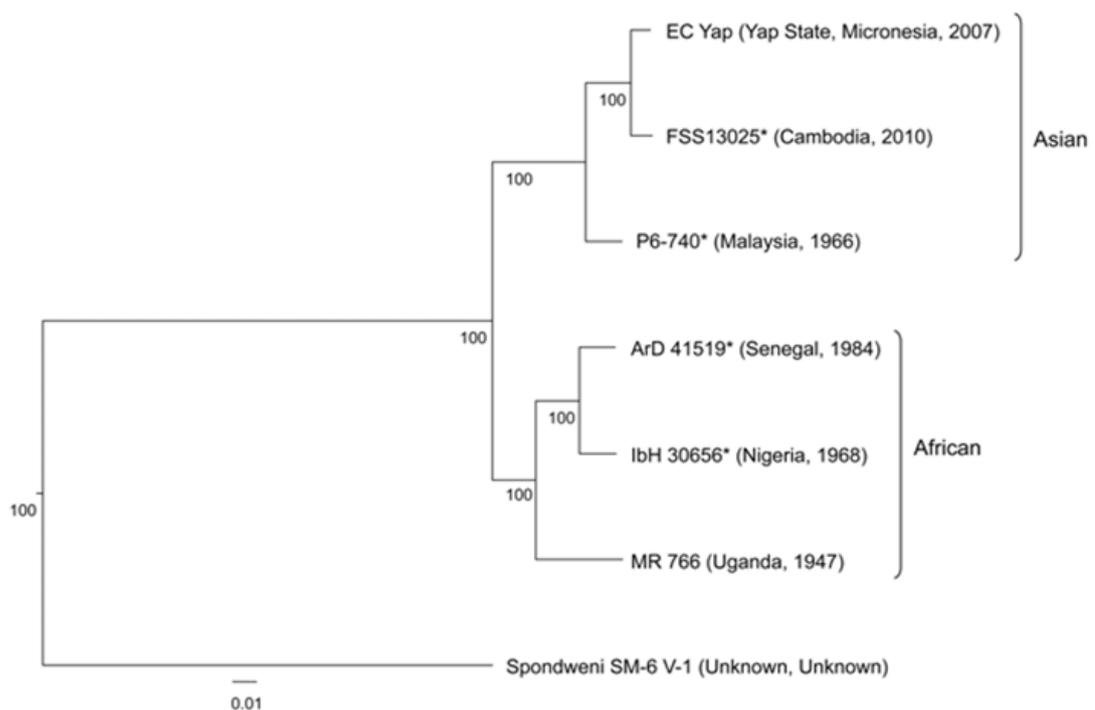
Seqüências genéticas de cepas do vírus da Zika isoladas no Camboja, Malásia, Nigéria, Senegal, Tailândia e Uganda foram publicados. Estas construíram árvores filogenéticas para avaliar as relações entre estas cepas. Posteriormente, estudos moleculares mapearam a disseminação do vírus de Uganda para África Ocidental e então para a Ásia na segunda metade do século 20 (FAYE, 2014).

Em adição, o antepassado comum mais recente do MR766 (Uganda, 1947) divergiu primeiro, seguido da divergência do antepassado comum mais recente das linhagens ArD 41519 (Senegal, 1984) e IbH 30656 (Nigéria, 1968), da cepa P6-740

(Malásia, 1966) e, finalmente, as estirpes da CE (Micronésia, 2007) e FS13025 (Camboja, 2010) (HADDOW, 2012) (**Figura 2**).

Análises filogenéticas sugerem que as cepas que circulam no Brasil são originadas de cepas da Polinésia Francesa (FAYE et al, 2014). O vírus de um dos pacientes teve seu genoma completo sequenciado e a sequência identificada possui 97-100% de homologia com o isolado da Polinésia Francesa (MLAKAR, 2016).

Após o relato de casos de microcefalia no Brasil e análise retrospectiva dos casos da Polinésia Francesa, o primeiro caso de microcefalia e outras alterações neurológicas foram relatados na Colômbia (BUTLER, 2016).



Fonte: HADDOW, 2012

**Figura 2: Filogenia a partir das sequências de nucleotídeos de cepas do Vírus da Zika**

### 2.3 Sintomatologia Clínicos do ZIKV em Humanos

Antes de 2007, apenas 13 casos de infecção em seres humanos com o vírus Zika haviam sido relatados (WIKAN, 2016). Na década de 1960 a 1980 foram

encontradas infecções humanas em toda a África e Ásia, mas geralmente acompanhadas de sintomas leves.

O primeiro grande surto de doença causado pela infecção na ilha de Yap (Estados Federados da Micronésia) foi em 2007. Posteriormente na Polinésia Francesa, entre 2013-2014, casos de síndrome de Guillain-Barré foram associados à infecção, assim como os casos de microcefalia em recém-nascidos (KINDHAUSER, 2016). Do mesmo modo, em 2015 no Brasil, registaram-se aumentos significativos na incidência dos distúrbios auto-imunes e neurológicos, incluindo a síndrome de Guillain-Barré e microcefalia (ŞAHINER, 2016; MLACKER, 2016).

De uma forma geral, a infecção tem sido caracterizada como moderadamente sintomática e raramente fatal. Embora a infecção assintomática seja comum, aproximadamente 20% dos adultos infectados com ZIKV apresentam sintomas e sinais, geralmente 3 a 12 dias após a infecção, que desaparecem dentro de 2 a 7 dias (SIKKA, 2016). Os sintomas incluem febre leve, dor de cabeça, artralgia, mialgia, conjuntivite não purulenta e erupção maculopapular pruriginosa, (MLACKER, 2016). As taxas de hospitalização e complicações são baixas, sendo as fatalidades extremamente raras (SIKKA, 2016). No entanto,

O ZIKV é transmitido principalmente pela picada do mosquito infectado, no entanto, pode se espalhar através de meios de transmissão não vetoriais, incluindo transfusões de sangue, relações sexuais e vias perinatal (MLACKER, 2016). Em adição, a disseminação da transmissão do vírus Zika pode ser aumentada não só pela distribuição global dos vetores *Aedes*, mas também por transmissão de pessoa para pessoa, tanto verticalmente (mãe para feto) quanto horizontalmente (KINDHAUSER, 2016).

A cepa viral e a dose parecem influenciar diretamente no resultado da infecção. Em seres humanos, a maioria dos casos de microcefalia é associada à linhagem Asiática de ZIKV, enquanto em camundongos, ambas as linhagens (Asiática e Africana) podem induzir patologia relacionada ao ZIKV (RAMOS DA SILVA, 2016).

#### **2.4 Modelo Animal para estudo do ZIKV**

Os primeiros estudos *in vivo* com ZIKV, em 1952, mostraram a susceptibilidade de camundongos adultos imunocompetentes selvagens (WT) Swiss webster à infecção intracerebral (DICK *et al.*, 1952), que se mostrou letal na maioria dos casos.

Esses estudos também mostraram a pouca susceptibilidade de camundongos selvagens adultos à infecção intraperitoneal com o vírus, o que demonstrava a provável capacidade do sistema imune desses animais de controlar a infecção. Até agora, estudos de infecção por ZIKV em camundongos WT adultos têm relatado apenas presença baixa e transitória de RNA viral, mas não infecciosa após inoculações subcutâneas *in vivo* (DOWALL et al., 2016; LAZEAR et al., 2016).

O ZIKV não se replica de forma eficiente em camundongos adultos selvagens (WT), este fenótipo pode ser explicado pela incapacidade do ZIKV de antagonizar o STAT2 em camundongos, como ocorre em humanos, o qual é ativado através da sinalização dos receptores de interferon tipo I e tipo III (ASHOUR et al., 2009).

Contudo, já foi demonstrado que camundongos selvagens com menos de 7 dias de vida são susceptíveis à infecção (DICK, 1952). Manifestações como: paralisia dos membros, pêlo eriçado, tremores, postura curvada, letargia, hiperatividade, perda de peso e morte têm sido observadas em diferentes modelos (transgênicos e neonatos) de infecção por ZIKV em camundongos (ALIOTA et al., 2016a; DOWALL et al., 2016; LAZEAR et al., 2016; ROSSI et al., 2016).

A infecção por ZIKV em um camundongo neonato imunocompetente mostrou tropismo cerebral, levando à microcefalia pós-natal e várias disfunções comportamentais (SOUZA, 2017). A microcefalia pós-natal ocorre, pois, o cérebro do camundongo recém-nascido é relativamente imaturo, semelhante ao estágio de desenvolvimento do cérebro humano em meados da gestação (SEMPLE et al., 2013). Sendo assim, Miner et al (2016) sugeriram que a observação de patologias do desenvolvimento neurológico de ZIKV em camundongos requer análise pós-natal. Em adição, período pós-natal de desenvolvimento do cérebro de roedores e a germinação sináptica se correlaciona com o último trimestre de gestação em seres humanos, simulando fetos expostos durante a gestação tardia (MORGANE, 1980; SOUZA et al., 2017).

Os primeiros estudos em animais usando uma cepa ZIKV isolado do Brasil (ZIKVBR) demonstraram que a associação com as alterações no desenvolvimento é dependente da linhagem do camundongo (CUGOLA et al., 2016), da cepa do vírus, da titulação viral, assim como *in vitro* depende do tipo celular (RAMOS DA SILVA, 2016).

O ZIKV tem tropismo por células neurais, principalmente células menos diferenciadas, no entanto, já foi demonstrada a infecção de células da pele, fígado, baço, rim, pulmão, gônadas, músculo e olho em modelos de camundongos transgênicos (ALIOTA et al., 2016; LAZEAR et al., 2016; MINER et al., 2016; ROSSI et al., 2016). Além disso, foi detectado RNA viral em lágrimas, sugerindo que o vírus pode ser secretado das glândulas lacrimais (MINER et al., 2016).

Yockey (2016) infectou camundongos WT imunocompetentes via vaginal com uma cepa asiática do ZIKV e observou que o ZIKV replica dentro da mucosa genital mesmo em camundongos de tipo selvagem, sendo a mucosa vaginal permissiva para a replicação do Vírus da Zika. A infecção vaginal durante a gestação levou à restrição do crescimento fetal e infecção do cérebro fetal, provando que essa via de inoculação é capaz de atingir fetos de camundongos com sistema imunológico intactos.

Modelos representativos de roedores para investigar infecções por ZIKV incluem inoculações diretamente no sistema nervoso central (SNC) no final da gravidez e transmissão transplacentária em camundongos imunodeficientes (GOODFELLOW et al., 2016). No entanto, as abordagens atuais para a infecção por modelo ZIKV em roedores resultam em letalidade durante a gravidez (SHAO et al., 2016). Em contrapartida, o cérebro de camundongo recém-nascido (neonato) é relativamente imaturo, semelhante ao estágio de desenvolvimento do cérebro humano em meados da gestação (SEMPLE et al., 2013), e esse desenvolvimento inclui um componente pós-natal importante. Sendo assim, sugeriu-se que a avaliação dos danos no desenvolvimento neurológico de ZIKV em camundongos fosse analisado também no período pós-natal (MINER et al., 2016).

O ZIKV infecta a íris, córnea, retina e nervo óptico e causa conjuntivite, panuveíte e neuroretinite em camundongos quando inoculados subcutaneamente. A infecção por ZIKV também resulta em doença ocular grave caracterizada por neurite óptica, atrofia coriorretiniana e cegueira em recém-nascidos e conjuntivite e uveíte em adultos (MINER et al., 2016).

Em camundongos recém-nascidos e jovens, a inoculação intracerebral demonstrou que a replicação de ZIKV ocorre tanto nos neurônios, como nas células astrogliais (GOODFELLOW et al., 2016).

Estudos recentes demonstraram que a infecção por ZIKV pode alterar a diferenciação de células neuro progenitoras (NPCs) levando a microcefalia

embrionária e a restrição do crescimento dos camundongos (CUGOLA et al., 2016; LI et al., 2016; MINER et al., 2016). A infecção pelo Vírus da Zika em modelo de camundongo revela aspectos importantes das anormalidades cerebrais fetais que são associadas à infecção por ZIKV em seres humanos, incluindo extensa apoptose neuronal, rarefação axonal, acumulação de astrócitos reativos e células microgliais (DRIGGERS et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; OLIVEIRA MELO et al., 2016). No entanto, não se sabe se outros tipos celulares, incluindo neurônios diferenciados e células vasculares, são danificados no cérebro em desenvolvimento, o que contribuiria para as anormalidades cerebrais associadas à infecção (SHAO, 2016).

Muitos estudos utilizando modelos de camundongos com *backgrounds* genéticos diversos, inoculados por diferentes vias, cepas e uma variedade de carga viral têm sido úteis para o entendimento dos impactos causados pela infecção pelo ZIKV (CALVET et al., 2016). A infecção subcutânea pela cepa Asiática em camundongos C57BL/6 gestantes resultou em morte fetal e reabsorção da maioria dos fetos enquanto aqueles que sobreviveram à infecção tiveram restrição de crescimento intrauterino (RAMOS DA SILVA, 2016). Animais transgênicos, sem resposta antiviral, nem sempre são a melhor opção quando se estuda patogênese (DOWALL, 2016).

Um modelo animal de infecção deve ser desenvolvido para identificar os determinantes da virulência de ZIKV e revelar mecanismos moleculares que controlam a interação vírus-hospedeiro, proporcionando uma estrutura para o desenho racional de terapias de fase aguda e teste de eficácia de vacinas, e assim fornecer informações valiosas para a avaliação de possíveis estratégias terapêuticas ou preventivas (ALIOTA et al., 2016).

Para alguns tipos de pesquisa, é desejável empregar grupos de animais que exibem níveis de variação genética paralela a ocorrência natural (FESTING, 1974). Ao contrário das linhagens isogênicas, um estoque heterogênico é definido como uma colônia de animais com um aumento limitado do coeficiente de endogamia <1% por geração e alto grau de variabilidade genética (FAHEY, 2013). Por isso, são usados para diferentes fins e a conservação da variabilidade genética é extremamente importante (POILEY, 1960). Animais *wild type* (WT-selvagens ou não modificados geneticamente), especialmente animais heterogênicos, como por exemplo os camundongos Swiss webster, apresentam uma variabilidade genética que representa

a população humana em que raramente ocorre o cruzamento intrafamiliar. Por esse motivo e por não apresentarem modificações genéticas em vias de sinalização importantes para a resposta anti-viral, esses animais se mostram como excelente modelo de estudo.

### 3. JUSTIFICATIVA

Estamos diante de uma causalidade sem precedente na história da saúde pública, envolvendo mulheres e crianças, como é a síndrome neurológica associada ao Zika. Nesse contexto, a complexidade em torno da epidemia de Zika requer esforços nos diversos campos da ciência, visto a extraordinária capacidade de transmissão desse vírus. O ZIKV tem sido associado a condições clínicas graves, contudo, não existem medicamentos antivirais aprovados ou vacinas disponíveis com atividade comprovada contra esse agente. A OMS declarou a propagação do ZIKV como uma emergência de Saúde Pública internacional no início de 2016. Sendo assim, a pesquisa em modelos animais é uma alternativa para a geração de conhecimentos de grande importância sobre a doença. Os primeiros estudos *in vivo* em busca de antivirais para o combate à infecção utilizaram animais com deficiência na resposta imunológica antiviral, especialmente animais *knockout* para componentes da via de interferon (IFN). Esses modelos transgênicos são altamente susceptíveis à infecção com qualquer uma das cepas virais disponíveis e embora eles sejam úteis no estudo do tropismo do vírus, para o teste de antivirais eles não representam o modelo mais adequado, visto que a participação do sistema imunológico do animal em sinergismo com o tratamento farmacológico na resposta contra o vírus é descartada. Poucas informações existem a respeito da caracterização da patologia causada pela infecção das cepas de ZIKV circulantes no Brasil em modelos animais não transgênicos ou imunocompetentes. Desta forma, neste trabalho avaliamos um modelo animal, utilizando camundongos heterogênicos Swiss webster, com a resposta imunológica antiviral intacta para avaliar aspectos patogênicos da infecção por ZIKV, possibilitando trabalhos futuros relacionados à prevenção e cura, incluindo teste pré-clínico de compostos antivirais, produção de vacinas e fármacos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho consiste em estabelecer uma ferramenta complementar, no que se refere à dinâmica comportamental do vírus da Zika, através do uso de camundongos neonatos Swiss webster aliados a biotecnologias experimentais que permitam a utilização desse biomodelo em testes pré-clínicos de compostos farmacológicos com atividade anti-viral.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração ideal a partir de quatro concentrações de partículas virais das três diferentes cepas do ZIKV, duas delas isoladas de pacientes brasileiros (PE e AB) e uma da linhagem asiática (MR766), para o estudo dos aspectos patológicos em camundongos Swiss webster neonatos.
- Verificar se a inoculação via intraperitoneal das diferentes cepas do ZIKV é capaz de infectar os neonatos, através da identificação da presença do vírus no tecido cerebral.
- Caracterizar a infecção pelas diferentes cepas do vírus Zika, coletando dados sobre morbidade e mortalidade.
- Estudar a patogênese do vírus da zika em um modelo murino de infecção pelo ZIKV visando contribuir com os avanços das pesquisas relacionadas à prevenção e cura, como a produção de vacinas e fármacos.

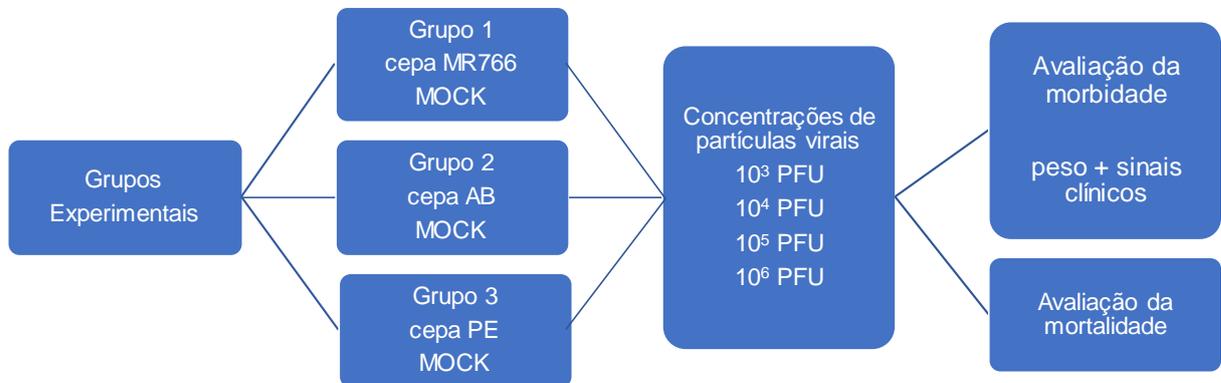
## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Animais experimentais e licenças

Os animais utilizados nesse experimento foram oriundos da colônia de produção do Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos/Fiocruz e ficaram alojados no biotério do Laboratório de Ultraestrutura Hertha Meyer, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ em gaiolas microisoladoras. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA (CONCEA 2016) e receberam aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em experimentação científica do CCS da UFRJ, registrada no CONCEA sobre o número de processo 01200.001568/2013-87; protocolo 009/16 (**Anexo 1**). Dezoito camundongos Swiss webster fêmeas com 8 semanas de idade foram acasaladas com nove machos da mesma cepa e da mesma idade na proporção de duas fêmeas para cada macho. A cópula foi confirmada pela observação da presença do *plug* vaginal e a gestação, após 15 dias, a partir da observação do aumento abdominal do animal. As fêmeas prenhes foram alojadas em microisoladores e mantidas em temperatura de  $22\pm 2$  °C, umidade relativa (UR) do ar em  $50\pm 10\%$ , fotoperíodo de 12 h de claro por 12 h de escuro e acesso *ad libitum* à água e comida. Após o parto, as fêmeas com sua ninhada foram separadas em gaiolas individuais. Foi utilizado um total de 18 fêmeas, 9 machos e 186 neonatos.

### 5.2 Determinação dos grupos experimentais

A fim de determinar a concentração ideal para o estudo dos aspectos patológicos, camundongos (*Mus musculus*, Swiss webster) neonatos com 3 dias de vida, foram inoculados intraperitonealmente com quatro diferentes concentrações ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  PFU) das cepas Brasileiras (AB e PE) e da cepa Africana (MR766) do vírus Zika. O Grupo 1 foi constituído de neonatos inoculados com a cepa MR766 e controle (MOCK), o grupo 2 com a cepa AB e controle (MOCK) e o grupo 3 com a cepa PE e controle (**Figura 3**).



**Figura 3: Grupos experimentais: contendo as três cepas virais e as quatro concentrações utilizadas**

Foram realizados dois experimentos, sendo que o primeiro foi utilizado como piloto.

Os animais foram avaliados todos os dias após o dia da inoculação que ocorreu em p3. As fêmeas e suas ninhadas foram divididos em grupos, que foi nomeada com uma letra do alfabeto. Os grupos controle (MOCK) foram constituídos pela fêmea progenitora e sua ninhada de 10 animais, os quais foram inoculados intraperitonealmente com o meio de cultura DMEM (grupo MR766) e L-15 (grupos AB e PE). Cada grupo experimental inoculado com partículas virais das cepas do ZIKV foi constituído pela fêmea progenitora e sua ninhada de 10 a 12 animais, a qual foi identificada por dois subgrupos de 5 animais que receberam duas concentrações diferentes de partículas virais. Cada animal dentro da ninhada foi numerado aleatoriamente de 1 até 10 e receberam identificação com caneta permanente. A ninhada do grupo controle não foi dividida (**Tabela 1**).

**Tabela 1: Grupos experimentais**

1º EXPERIMENTO										
Grupo	Cepa Viral	n	Inóculo/ animal	Concentração Viral		Inoculação (dias devida)	Início dos Sinais Clínicos (dpi)		Tempo (dias) de Experimento	Observações
A	MOCK (VERO)	10	50 ul	#1 - #10		p3	X		6	Todos os animais foram a óbito no 6dpi
B	MR766	10	50 ul	10 <sup>3</sup> PFU (#1 - #5)	10 <sup>4</sup> PFU (#6 - #10)	p3	6	6	6	
C	MR766	10	50 ul	10 <sup>5</sup> PFU (#1 - #5)	10 <sup>6</sup> PFU (#6 - #10)	p3	6	6	6	
D	MOCK (C6/36)	10	50 ul	#1 - #10		p3	X		30	
E	ZIKV BR (AB)	10	50 ul	10 <sup>3</sup> PFU (#1 - #5)	10 <sup>4</sup> PFU (#6 - #10)	p3	11	8	30	
F	ZIKV BR (AB)	10	50 ul	10 <sup>5</sup> PFU (#1 - #5)	10 <sup>6</sup> PFU (#6 - #10)	p3	9	9	30	
I	MOCK (C6/36)	10	50 ul	#1 - #10		p3	9		14	Os animais dos GRUPOS D, E e F sofreram ponto final humanitário no 14dpi.
J	ZIKV BR (PE)	10	50 ul	10 <sup>3</sup> PFU (#1 - #5)	10 <sup>4</sup> PFU (#6 - #10)	p3	9	9	14	
K	ZIKV BR (PE)	10	50 ul	10 <sup>5</sup> PFU (#1 - #5)	10 <sup>6</sup> PFU (#6 - #10)	p3	9	9	14	
2º EXPERIMENTO										
Grupo	Cepa Viral	n	Inóculo/ animal	Concentração Viral		Inoculação (dias devida)	Início dos Sinais Clínicos (dpi)		Tempo (dias) de Experimento	Observações
L	MOCK (VERO)	10	50 ul	#1 - #10		p3	X		6	Todos os animais foram a óbito no 6dpi
M	MR766	10	50 ul	10 <sup>3</sup> PFU (#1 - #5)	10 <sup>4</sup> PFU (#6 - #10)	p3	6	6	6	
N	MR766	10	50 ul	10 <sup>5</sup> PFU (#1 - #5)	10 <sup>6</sup> PFU (#6 - #10)	p3	6	6	6	
O	MOCK (C6/36)	10	50 ul	#1 - #10		p3	X		23	Os animais do GRUPO Q sofreram ponto final humanitário no 14dpi.
P	ZIKV BR (AB)	10	50 ul	10 <sup>3</sup> PFU (#1 - #5)	10 <sup>4</sup> PFU (#6 - #10)	p3	11	8	23	
Q	ZIKV BR (AB)	10	50 ul	10 <sup>5</sup> PFU (#1 - #5)	10 <sup>6</sup> PFU (#6 - #10)	p3	9	9	14	
R	MOCK (C6/36)	10	50 ul	#1 - #10		p3	9		28	No dia 0dpi (dia da inoculação), A progenitora do GRUPO R realizou canibalismo em 4 filhotes.
S	ZIKV BR (PE)	10	50 ul	10 <sup>3</sup> PFU (#1 - #5)	10 <sup>4</sup> PFU (#6 - #10)	p3	9	9	28	
T	ZIKV BR (PE)	10	50 ul	10 <sup>5</sup> PFU (#1 - #5)	10 <sup>6</sup> PFU (#6 - #10)	p3	9	9	28	

### 5.3 Obtenção das cepas virais, propagação e titulação de ZIKV

Na infecção dos camundongos neonatos, foi utilizada uma cepa africana de ZIKV (MR766), cedida pelo professor Dr. Davis Ferreira (UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil) e duas cepas brasileiras isoladas, uma proveniente de um paciente do estado do Espírito Santo (AB - BRZIKV\_AB\_ES; KX212103.1), cedida pela Dra. Ana Maria Bispo de Filipis (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), e outra do estado de Pernambuco (PE - Brazil/PE243/2015; KX197192.1), cedido pela Dra. Marli Tenório Cordeiro (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz-Recife, Brasil). Para estabelecer o estoque viral, a cepa MR766 foi inoculada em células VERO (ATCC® CCL 81™, Manassas, VA 20108 USA) (MOI=0.01). Já as cepas brasileiras, AB e PE, foram inoculadas em células C6/36 (ATCC® CRL-1660™). Após 1 hora, o inóculo viral foi removido para as células VERO, em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB). Já para as células C6/36, foi adicionado o meio L-15 (Thermo Fisher Scientific, EUA) suplementado com 2% de SFB e incubados em estufa (37°C, atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>). Após 4 dias de infecção, o meio condicionado contendo as partículas de ZIKV (substrato) foi coletado e centrifugado a 300 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi então coletado e submetido à filtração em membrana de 0,22 mm, aliquotado e armazenado a -80°C. Os títulos dos estoques de ZIKV foram determinados pelo ensaio de placa de lise em células VERO. Monocamadas

confluentes de VERO, cultivadas em placas de 12 poços, foram inoculadas com os estoques virais diluídos serialmente (até 8 vezes na base de 10). Após 1 hora de incubação em estufa (37°C, atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>), o inóculo foi descartado e as células incubadas com 1% de CMC em  $\alpha$ -MEM suplementado com 1% de SFB. Após 5 dias, as células foram fixadas com formaldeído 4% e coradas em solução de cristal violeta (cristal violeta 0,5% em etanol 20%) para a contagem das placas de lise. A partir da contagem direta das regiões com lise na monocamada de células VERO, foi possível estimar o título destes estoques virais, dado por unidades formadoras de plaque por ml (PFU/ml).

#### **5.4 Inoculação dos neonatos Swiss webster**

Para inoculação de partículas virais, os neonatos foram contidos mecanicamente com as mãos e inoculados intraperitonealmente com o volume de 50 $\mu$ l do estoque viral, utilizando seringas de insulina BD ultrafina 30G (8mm x 0,3mm). Os grupos controle (MOCK) foram inoculados intraperitonealmente com o volume de 50 $\mu$ l de meio de cultura DMEM ou L-15.

#### **5.5 Avaliação dos neonatos pós-infecção (sinais clínicos, curva de peso e taxa de sobrevivência dos animais infectados)**

Os neonatos foram observados diariamente, quanto ao surgimento de sinais da doença (aspecto geral, alteração de comportamento e peso). Os sinais clínicos foram avaliados segundo Dick (1952), sendo observado criteriosamente o aparecimento de tremores, desequilíbrio, letargia, paralisia de membros, agitação (hiperatividade), agressividade, caquexia, melhora clínica e óbito. Os animais foram ainda pesados diariamente. Todas as informações coletadas foram devidamente registradas em planilhas.

Os animais que apresentaram perda maior que de 20% do peso inicial e/ou sinais debilitantes de doença (principalmente paralisia) sofreram ponto final humanitário por deslocamento cervical seguido de decapitação, seguindo as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA (<https://ceuaics.ufba.br/legislacao/resolucoes?page=2>). Ao fim dos experimentos, as

progenitoras sofreram ponto final humanitário por overdose de anestésico (Cloridrato de cetamina + xilasina, intraperitoneal, 3x mais concentrada do que a utilizada para anestesia 50-100mg/kg), seguida de deslocamento cervical (CONCEA, 2013).

### **5.6 Coleta dos tecidos para confirmação da infecção viral através do ensaio de placa de lise**

Os tecidos cerebrais foram coletados e direcionados para o ensaio de placa de lise, a fim de avaliar a replicação efetiva do ZIKV nestes órgãos.

Imediatamente após a coleta, aproximadamente 30 mg de cada tecido foi dissociado com auxílio do macerador TissueRuptor (QIAGEN, Hilden, Düsseldorf, DE) em 1 ml de DMEM suplementado com 1% de SFB.

O ensaio de placa de lise, para avaliar replicação viral nos tecidos dos animais infectados foi realizado da mesma maneira que a titulação dos estoques de ZIKV, utilizando células VERO para análise.

De posse desses resultados, avaliamos a concentração viral que foi utilizada para os ensaios. Essa avaliação se deu pela comparação dos títulos virais alcançados nos tecidos do sistema nervoso central.

Outros tecidos e órgão, como: retina, gânglios da raiz dorsal, nervos trigêmeo e ciático, coração, baço, rim, fígado e gônadas foram retirados e congelados para futuras análises histopatológicas.

### **5.7 Análise dos resultados**

A partir das planilhas, determinamos as curvas de peso e de sobrevivência, assim como a presença de sinais clínicos, que foram divididos em categorias, para cada concentração de partículas virais das cepas brasileiras e da cepa africana. Os dados da curva de peso e taxa de sobrevivência foram analisados por análise de variância usando o teste estatístico *Two Way ANOVA*. De posse desses resultados, correlacionamos a concentração viral que causava sinais clínicos relevantes nos animais.

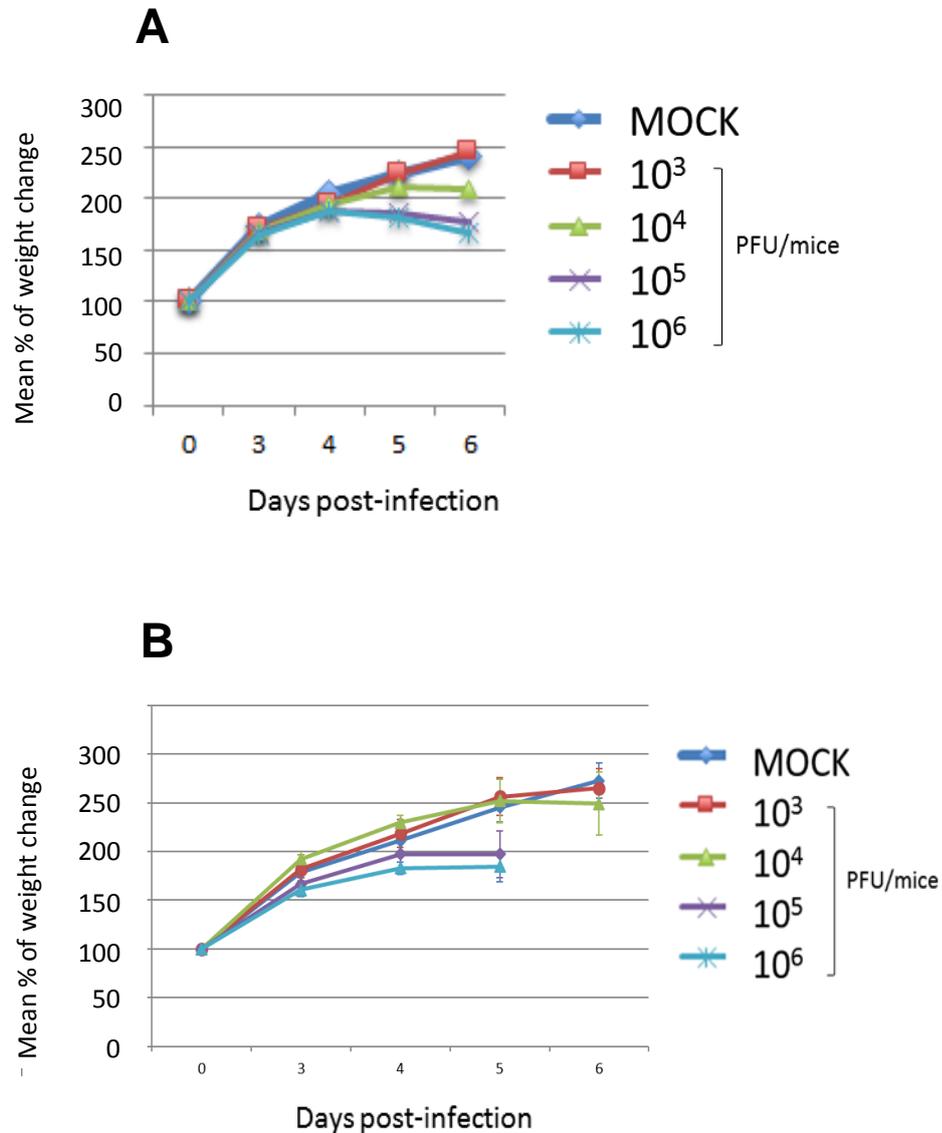
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Curva de peso dos neonatos

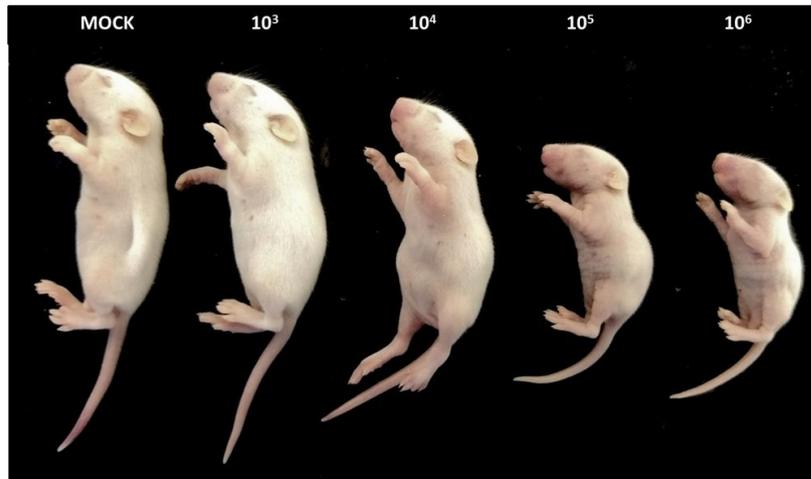
#### 6.1.1 Animais inoculados com a cepa Africana do vírus da Zika (MR766).

Os animais inoculados com a concentração de  $10^3$  PFU da cepa MR766 não apresentaram perda de peso significativa ( $p>0,05$ ) em nenhum dos experimentos quando comparado ao controle e aos animais inoculados com  $10^4$  PFU. No entanto, quando comparado aos inoculados com  $10^5$  e  $10^6$  PFU, houve perda de peso significativa ( $p<0,001$ ). Os animais inoculados com  $10^4$  PFU mantiveram a média de pesos quando comparados aos animais controle (MOCK) até o 5dpi nos dois experimentos. No entanto, entre o quinto e o sexto dia dos experimentos, foi possível observar um desenvolvimento deficiente, mas ainda assim não foi significativo ( $p>0,05$ ) quando comparados ao controle e aos inoculados com  $10^3$  PFU. No entanto, quando comparado aos inoculados com  $10^5$  e  $10^6$  PFU, houve perda de peso significativa ( $p<0,001$ ). Os animais inoculados com  $10^5$  PFU, no primeiro experimento apresentaram perda de peso progressiva a partir do 3dpi, assim como no 2º experimento. Processo semelhante ao que ocorreu com os animais inoculados com  $10^6$  PFU. Ambas as concentrações inoculadas ( $10^5$  e  $10^6$  PFU), promoveram uma perda de peso significativa ( $p<0,001$ ) nos animais, quando comparados ao controle e os animais inoculados com  $10^3$  e  $10^4$  PFU, mas não apresentaram perda de peso significativa ( $p>0,05$ ) quando comparados entre si. Os animais controles (MOCK) apresentaram ganho progressivo de peso durante os dois experimentos. (**Figura 4**).

A cepa MR766 se mostrou altamente letal, e os animais infectados atingiram os critérios de ponto final humanitário no sexto dia de experimento. Desta forma, os experimentos com essa cepa não ultrapassaram 6 dias (**Figura 5**).



**Figura 4: Gráficos das curvas de peso dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Africana do vírus da Zika (MR766).** (A) 1º experimento: Mock (n=10), 10<sup>3</sup>(n=5), 10<sup>4</sup>(n=5), 10<sup>5</sup>(n=5), 10<sup>6</sup>(n=5). (B) 2º experimento: Mock (n=10), 10<sup>3</sup>(n=5), 10<sup>4</sup>(n=5), 10<sup>5</sup>(n=5), 10<sup>6</sup>(n=5). Todos os camundongos WT Swiss webster foram inoculados em p3 (pós-nato 3 dias), via intraperitoneal (50µL) com as diferentes concentrações da cepa MR766, e pesados diariamente. Os pesos estão expressos em porcentagem do peso corporal. Os resultados apresentados se referem a Média ± Desvio Padrão e os dados das curvas de peso foram normalizados e analisados por “Two Way ANOVA”. As análises de peso foram registradas até o 6dpi. Concentração 10<sup>3</sup> PFU x MOCK (p>0,05); 10<sup>3</sup> PFU x 10<sup>4</sup> PFU (p>0,05); 10<sup>3</sup> PFU x 10<sup>5</sup> PFU (p<0,001); 10<sup>3</sup> PFU x 10<sup>6</sup> PFU (p<0,001); 10<sup>4</sup> PFU x MOCK (p>0,05); 10<sup>4</sup> PFU x 10<sup>5</sup> PFU (p<0,001); 10<sup>4</sup> PFU x 10<sup>6</sup> PFU (p<0,001); 10<sup>5</sup> PFU x MOCK (p<0,001); 10<sup>5</sup> PFU x 10<sup>6</sup> PFU (p>0,05); 10<sup>6</sup> PFU x MOCK (p<0,001).



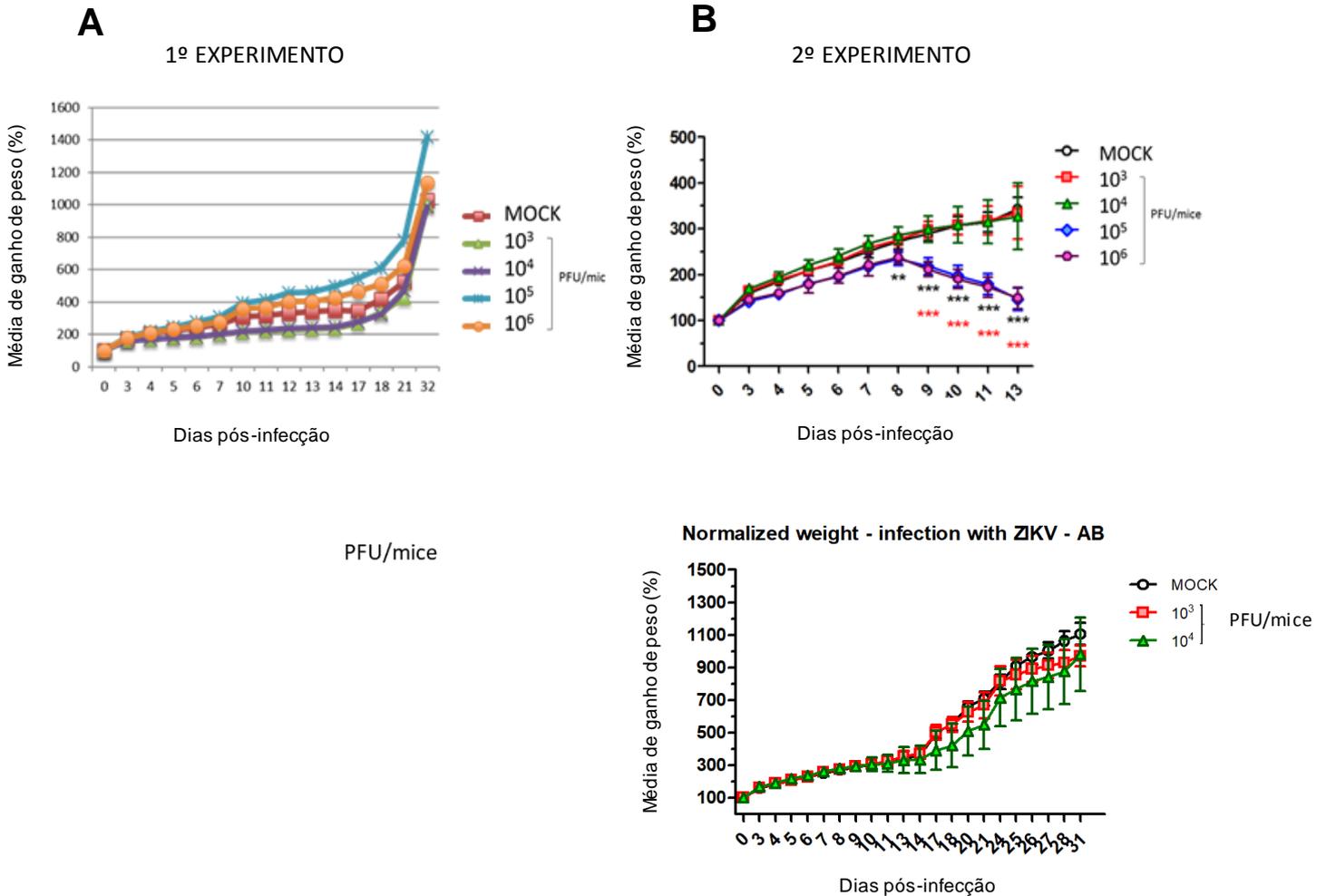
Fonte: Acervo Fábio Lima Monteiro

**Figura 5: Animais inoculados com a cepa MR766 - 6dpi.** Animais inoculados via intraperitoneal com a cepa MR766 do ZIKV nas concentrações de  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  PFU. A imagem mostra uma diminuição progressiva do tamanho dos neonatos (6dpi), associado ao aumento da concentração viral aplicada. Sendo inversamente proporcional, quanto maior a carga viral, menor o desenvolvimento com o mesmo tempo de vida.

#### 6.1.2 Animais inoculados com a cepa Asiática do vírus da Zika (AB)

Nenhum dos animais das diferentes concentrações inoculadas com a cepa AB apresentou perda de peso significativa ( $p > 0,05$ ) no 1º experimento, quando comparados ao controle e entre si. No 2º experimento, também não foi observado perda de peso significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparado ao controle (MOCK) e entre si, nos animais inoculados com as concentrações de  $10^3$  e  $10^4$  PFU. No entanto, todos os animais inoculados com  $10^5$  e  $10^6$  PFU perderam peso significativamente ( $p < 0,001$ ), quando comparados ao controle e aos inoculados com  $10^3$  e  $10^4$  PFU, a partir do 8dpi, sendo superior a 20% do peso inicial em 14dpi e foram imediatamente submetidos ao ponto final humanitário por deslocamento cervical, seguido de decapitação, de acordo com as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Entretanto, os animais inoculados com as concentrações de  $10^5$  e  $10^6$  PFU não apresentaram perda de peso significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparados entre si. Os inoculados com  $10^3$  e  $10^4$  PFU tiveram seus pesos aferidos até 30dpi (**Figura 6**), e ao final do experimento, apresentaram perda de peso significativa ( $p < 0,001$ ) apenas quando comparados aos inoculados com  $10^5$  e  $10^6$  PFU.

A cepa asiática AB promoveu um desenvolvimento retardado nos animais infectados (**Figura7**).



**Figura 6: Gráficos das curvas de peso dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Asiática do vírus da Zika).** (A) 1º experimento: Mock ( $n=10$ ),  $10^3$  ( $n=5$ ),  $10^4$  ( $n=5$ ),  $10^5$  ( $n=5$ ),  $10^6$  ( $n=5$ ). (B) 2º experimento: Mock ( $n=10$ ),  $10^3$  ( $n=5$ ),  $10^4$  ( $n=5$ ),  $10^5$  ( $n=5$ ),  $10^6$  ( $n=5$ ). Todos os camundongos WT Swiss webster destes ensaios foram inoculados em p3 (pós-nato 3 dias), via intraperitoneal ( $50\mu\text{L}$ ) com as diferentes concentrações da cepa AB, e pesados diariamente. Os pesos estão expressos em porcentagem do peso corporal. Os resultados apresentados se referem a Média  $\pm$  Desvio Padrão e os dados das curvas de peso foram normalizados e analisados por “Two Way ANOVA”. Concentração  $10^3$  PFU x MOCK ( $p>0,05$ );  $10^3$  PFU x  $10^4$  PFU ( $p>0,05$ );  $10^3$  PFU x  $10^5$  PFU ( $p<0,001$ );  $10^3$  PFU x  $10^6$  PFU ( $p<0,001$ );  $10^4$  PFU x MOCK ( $p>0,05$ );  $10^4$  PFU x  $10^5$  PFU ( $p<0,001$ );  $10^4$  PFU x  $10^6$  PFU ( $p<0,001$ );  $10^5$  PFU x MOCK ( $p<0,001$ );  $10^5$  PFU x  $10^6$  PFU ( $p>0,05$ );  $10^6$  PFU x MOCK ( $p<0,001$ ). Foram incluídos na análise, valores de peso até o 30dpi no 1º e 14dpi no 2º experimento.



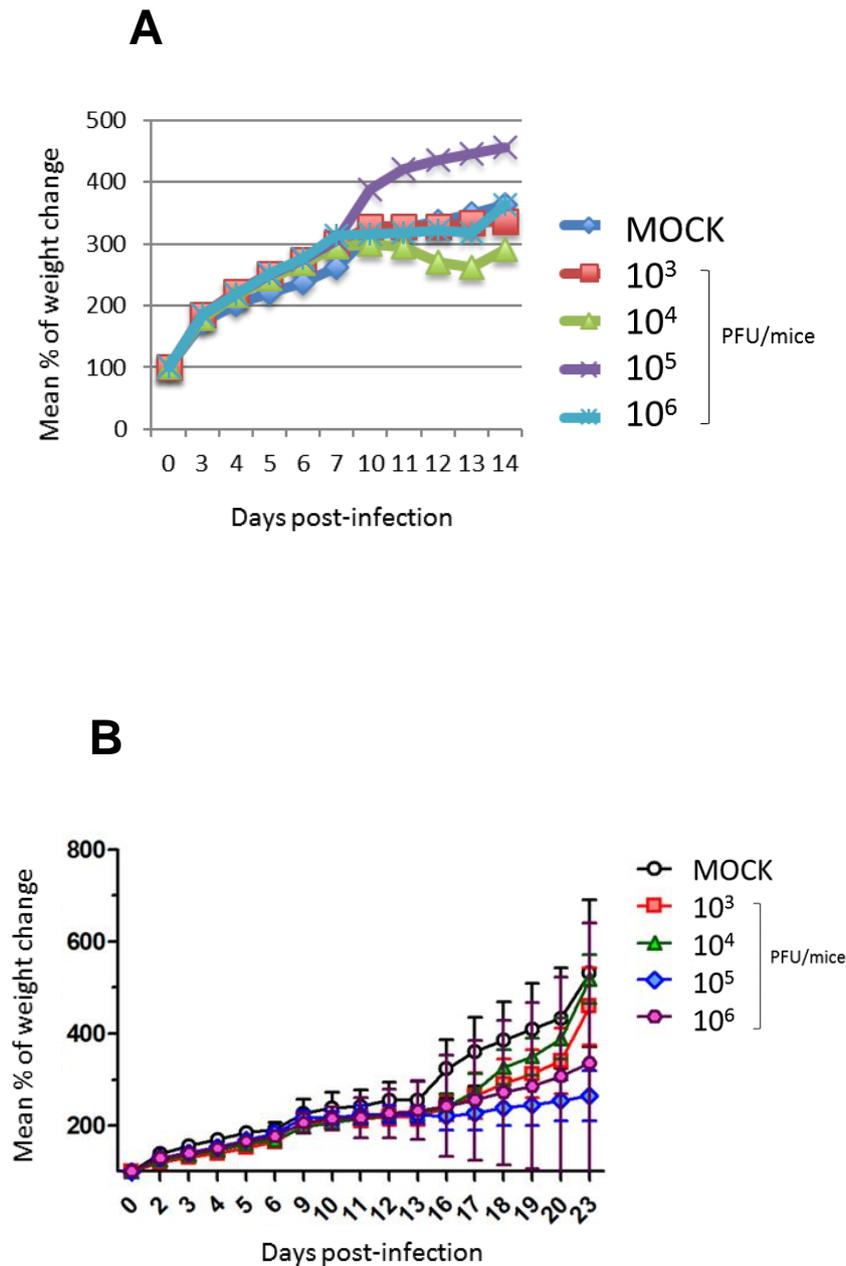
Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 7: Animais inoculados com a cepa AB – 21dpi.** A imagem mostra um desenvolvimento retardado dos neonatos, associado ao aumento da concentração viral aplicada. Sendo inversamente proporcional, quanto maior a carga viral, menor o desenvolvimento com o mesmo tempo de vida.

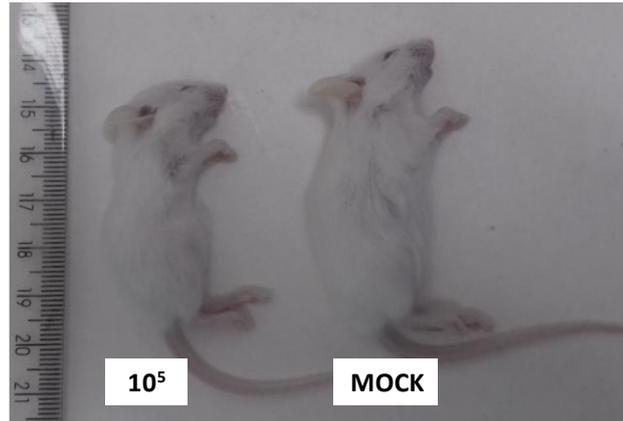
### 6.1.3 Animais inoculados com a cepa Asiática do vírus da Zika (PE)

Os animais inoculados com  $10^3$  PFU da cepa PE não apresentaram perda de peso significativa ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos experimentos quando comparados ao controle e aos animais inoculados com  $10^4$  PFU. Porém, quando foram comparados com os inoculados com as maiores concentrações ( $10^5$  e  $10^6$  PFU), foi possível observar uma perda de peso significativa ( $p < 0,001$ ). No entanto, em relação aos animais infectados com  $10^4$  PFU, obtivemos resultados diferentes nos dois experimentos. No 1º, os animais apresentaram perda de peso significativa ( $p < 0,001$ ) a partir do 10dpi. Variação essa que não aconteceu no 2º experimento, onde não houve perda de peso significativa ( $p > 0,05$ ) em nenhum momento quando comparados ao controle e aos inoculados com  $10^3$  PFU. No 1º experimento, observamos um ganho de peso substancial e significativo ( $p < 0,001$ ) nos animais inoculados com a concentração viral de  $10^5$  PFU, a partir de 7dpi quando comparados ao controle e aos inoculados com as menores concentrações, porém no 2º experimento, eles mantiveram seus pesos estáveis até o 17dpi, e só depois começaram a ganhar peso. No 2º experimento, também observamos um pequeno ganho de peso dos animais controle após o 12dpi, o que coincidiu com a introdução de alimentação sólida para os animais. Os animais inoculados com  $10^6$  PFU não apresentaram perda de peso no 1º experimento, mas no 2º experimento, houve perda de peso significativa ( $p < 0,001$ ) a partir do 13dpi, quando comparado ao controle (MOCK) e aos grupos inoculados com  $10^3$  e  $10^4$  PFU. As análises de peso foram registradas até 14dpi no 1º experimento e até 23dpi no 2º experimento. **(Figura 8).**

É importante notar que, embora não tenha ocorrido perda de peso significativa em todos os grupos experimentais, os animais infectados tendem a ser menores que os animais não infectados com o ZIKV **(Figura 9).**



**Figura 8: Gráficos das curvas de peso dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Asiática do Vírus da Zika (PE).** As análises de peso foram registradas até o 14dpi no 1º e 23dpi no 2º experimento. **(A)** 1º experimento: Mock ( $n=10$ ),  $10^3$ ( $n=5$ ),  $10^4$ ( $n=5$ ),  $10^5$ ( $n=5$ ),  $10^6$ ( $n=5$ ). **(B)** 2º experimento: Mock ( $n=10$ ),  $10^3$ ( $n=5$ ),  $10^4$ ( $n=5$ ),  $10^5$ ( $n=5$ ),  $10^6$ ( $n=5$ ). Todos os camundongos WT Swiss webster destes ensaios foram inoculados em p3 (pós-nato 3 dias), via intraperitoneal (50 $\mu$ L) com as diferentes concentrações da cepa PE, e pesados diariamente. Os pesos estão expressos em porcentagem do peso corporal. Os resultados apresentados se referem a Média  $\pm$  Desvio Padrão e os dados das curvas de peso foram normalizados e analisados por "Two Way ANOVA". Concentração  $10^3$  PFU x MOCK ( $p>0,05$ );  $10^3$  PFU x  $10^4$  PFU ( $p>0,05$ );  $10^3$  PFU x  $10^5$  PFU ( $p<0,001$ );  $10^3$  PFU x  $10^6$  PFU ( $p<0,001$ );  $10^4$  PFU x MOCK ( $p>0,05$ );  $10^4$  PFU x  $10^5$  PFU ( $p<0,001$ );  $10^4$  PFU x  $10^6$  PFU ( $p<0,001$ );  $10^5$  PFU x MOCK ( $p<0,001$ );  $10^5$  PFU x  $10^6$  PFU ( $p>0,05$ );  $10^6$  PFU x MOCK ( $p<0,001$ ).



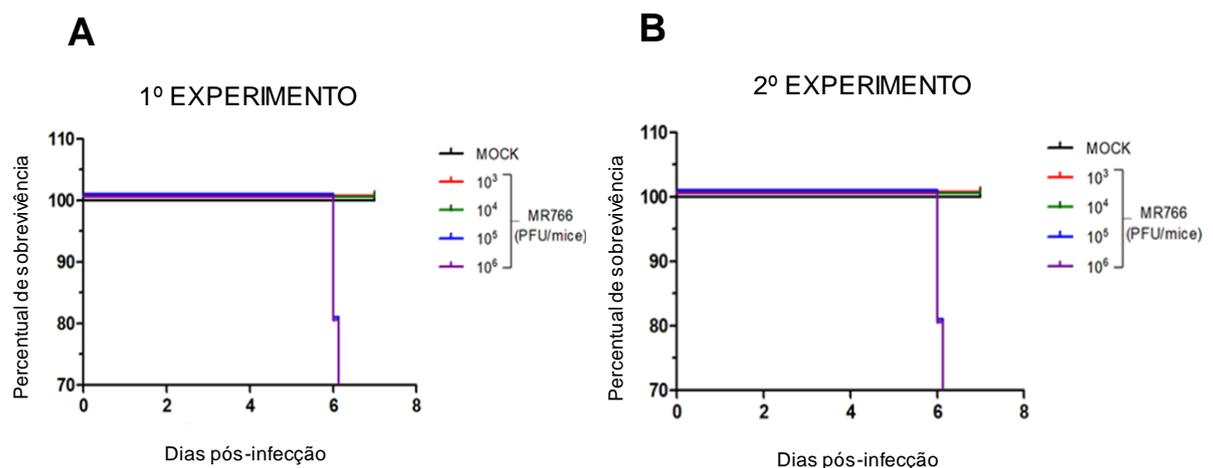
Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 9: Animais inoculados com a cepa PE - 14dpi.** A imagem mostra uma diminuição de tamanho do animal inoculado com  $10^5$  PFU da cepa PE em comparação com o animal controle (MOCK).

## 6.2. Taxa de sobrevivência dos neonatos infectados

### 6.2.1 Animais inoculados com a cepa africana do Vírus da Zika (MR766)

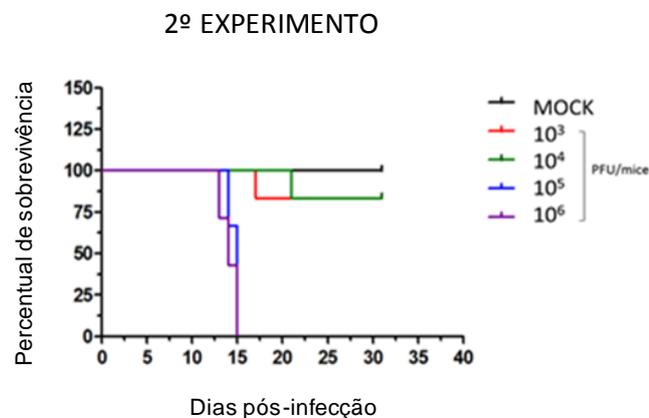
Nos dois experimentos, ao 6dpi, dois animais inoculados com a concentração de  $10^5$  PFU da cepa africana, foram a óbito, assim como os cinco animais que receberam  $10^6$  PFU. Diante do estado geral dos animais que receberam outras concentrações, exceto o controle (MOCK), foi realizado o ponto final humanitário de todos os grupos experimentais (**Figura 10**).



**Figura 10: Gráficos de taxa de sobrevivência dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Africana do Vírus da Zika (MR766).** (A) 1º e experimento: Mock ( $n=10$ ),  $10^3$  ( $n=5$ ),  $10^4$  ( $n=5$ ),  $10^5$  ( $n=5$ ),  $10^6$  ( $n=5$ ). (B) 2º experimento: Mock ( $n=10$ ),  $10^3$  ( $n=5$ ),  $10^4$  ( $n=5$ ),  $10^5$  ( $n=5$ ),  $10^6$  ( $n=5$ ). Todos os camundongos WT Swiss webster destes ensaios foram inoculados em p3 (pós-nato 3 dias), via intraperitoneal ( $50\mu\text{L}$ ) com as diferentes concentrações da cepa MR766, monitorados diariamente. O ensaio foi até o 6dpi nos dois experimentos.

### 6.2.2 Animais inoculados com a cepa Asiática do vírus da Zika (AB)

No primeiro experimento não houve registro de óbitos em nenhum dos animais inoculados com a cepa AB, no entanto, no segundo experimento, um animal inoculado com  $10^3$  PFU foi a óbito no 17dpi e um animal que recebeu  $10^4$  PFU não resistiu e foi a óbito no 21dpi. Os inoculados com  $10^5$  e  $10^6$  PFU sofreram ponto final humanitário no 14dpi por deslocamento cervical, seguindo as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA por apresentarem perda de peso superior a 20% do peso inicial gradativa a partir do 8dpi. (**Figura 11**).



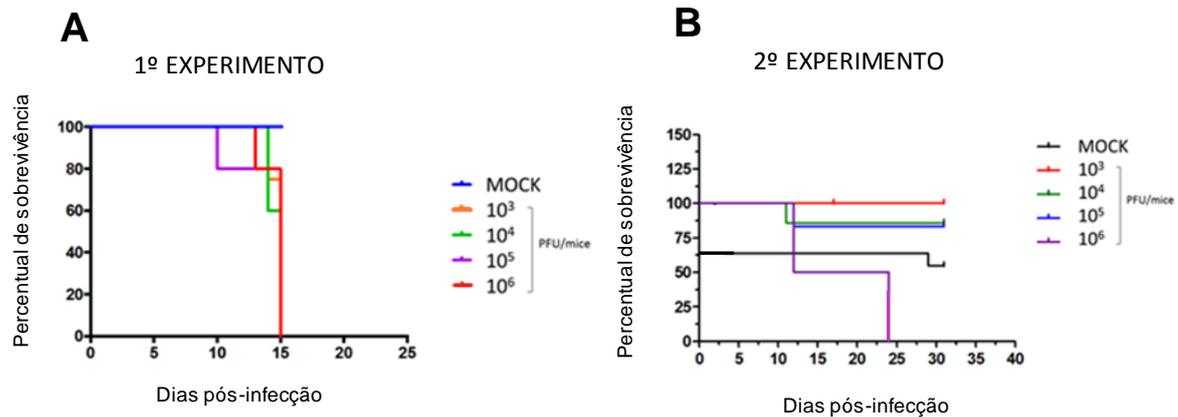
**Figura 11: Gráficos de taxa de sobrevivência dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa Asiática do Vírus da Zika (AB).** (A) 2º experimento: Mock (n=10),  $10^3$ (n=5),  $10^4$ (n=5),  $10^5$ (n=5),  $10^6$ (n=5). Todos os camundongos WT Swiss webster do ensaio foram inoculados em p3 (pós-nato 3 dias), via intraperitoneal (50µL) com as diferentes concentrações da cepa AB, monitorados diariamente. O ensaio foi até o 30dpi.

### 6.2.3 Animais inoculados com a cepa Asiática do vírus da Zika (PE)

No 1º experimento, todos os animais inoculados com diferentes concentrações foram a óbito a partir do 10 dpi. Um animal inoculado com  $10^3$  PFU foi a óbito no 14dpi, assim como dois animais que receberam a concentração d  $10^4$  PFU. Um animal inoculado com  $10^5$  PFU foi a óbito no 10dpi. Um animal inoculado com a maior concentração ( $10^6$  PFU), foi a óbito no 13dpi e o restante sucumbiu no 14dpi, quando o experimento foi finalizado com o ponto final humanitário de todos os animais. No segundo experimento aconteceram alguns contratemplos, começando pelo canibalismo de 4 animais do controle (MOCK) pela progenitora no 0dpi e outro não se desenvolveu e foi a óbito no 28dpi. Os que receberam  $10^3$  PFU resistiram até o termino do 2º experimento, enquanto que um dos animais inoculados com  $10^4$  PFU apresentou óbito no 11dpi. Um animal desafiado com  $10^5$  PFU foi a óbito no 12dpi.

Em 12dpi, três animais inoculados com  $10^6$  PFU foram a óbito e os dois restantes ficaram muito debilitados, agravando o quadro clínico e terminaram indo a óbito no 28dpi.

Os demais grupos foram acompanhados até o 28dpi (**Figura 12**).

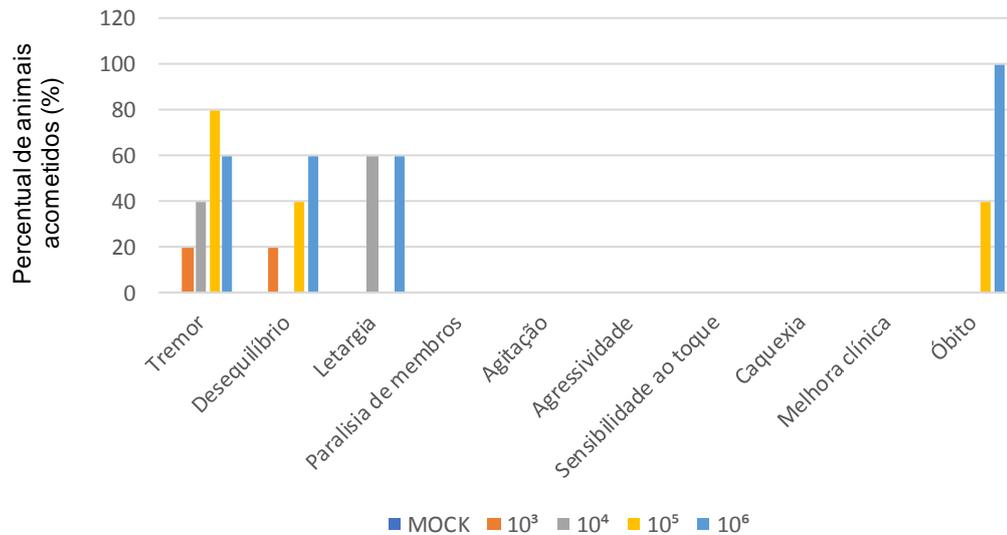


**Figura 12: Gráficos de taxa de sobrevivência dos animais inoculados com as diferentes concentrações da cepa asiática do Vírus da Zika (PE).** (A) 1º experimento: Mock (n=10),  $10^3$ (n=5),  $10^4$ (n=5),  $10^5$ (n=5),  $10^6$ (n=5). (B) 2º experimento: Mock (n=10),  $10^3$ (n=5),  $10^4$ (n=5),  $10^5$ (n=5),  $10^6$ (n=5). Todos os camundongos WT Swiss webster destes ensaios foram inoculados em p3 (pós-nato 3 dias), via intraperitoneal ( $50\mu\text{L}$ ) com as diferentes concentrações da cepa PE, monitorados diariamente. O ensaio foi até o 14dpi no 1º e 28dpi no 2º experimento.

### 6.3 Sinais clínicos

#### 6.3.1 Animais inoculados com a cepa africana do vírus da Zika (MR766)

Os 10 animais do controle (MOCK) não apresentaram nenhum sinal clínico, enquanto todos os animais inoculados com diferentes concentrações apresentaram sinais da infecção no 6dpi. Foi observado tremores e desequilíbrio em um animal inoculado com a concentração de  $10^3$  PFU. Três animais inoculados com  $10^4$  PFU apresentaram letargia, e dois animais, tremores. Já quatro animais inoculados com  $10^5$  PFU foram acometidos por tremores e desequilíbrio, e dois deles foram a óbito no 6dpi. Todos os animais inoculados com  $10^6$  PFU progrediram ao óbito no 6dpi após três deles desenvolverem intensa letargia, tremores e desequilíbrio (**Figura 13**).

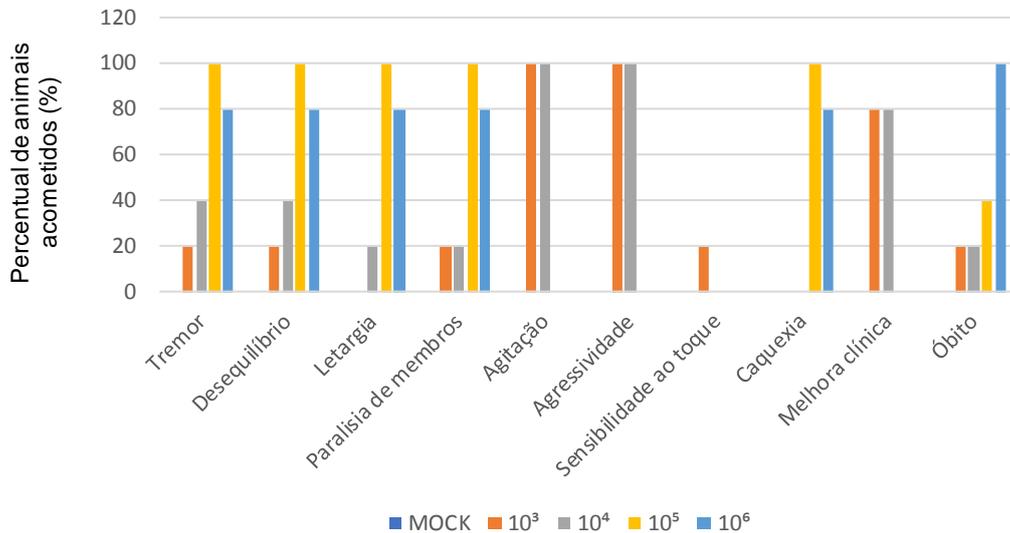


**Figura 13: Sinais Clínicos dos animais inoculados com a cepa africana (MR766).** Mock ( $n=10$ ),  $10^3$  ( $n=5$ ),  $10^4$  ( $n=5$ ),  $10^5$  ( $n=5$ ),  $10^6$  ( $n=5$ ). Todos os camundongos WT Swiss webster destes ensaios foram inoculados em p3 (pós-nato 3 dias), via intraperitoneal ( $50\mu\text{L}$ ) com as diferentes concentrações da cepa MR766, e avaliados diariamente no período da tarde. O experimento foi até o 6dpi.

### 6.3.2 Animais inoculados com a cepa Asiática do vírus da Zika (AB)

Os animais do controle (MOCK) não apresentaram alterações. Dos animais inoculados com  $10^3$  PFU da cepa AB, um apresentou tremores, desequilíbrio e paralisia de membros no 11dpi e evoluiu ao óbito no 17dpi. Nos outros cinco animais foram observados agressividade e agitação, mas apenas um apresentou sensibilidade ao toque. Quatro animais ficaram agitados e agressivos ao serem manipulados no 13dpi e no 21dpi, todos os sobreviventes apresentaram agressividade extrema. Nos animais inoculados com  $10^4$  PFU, um apresentou paralisia de membros posteriores no 8dpi e dois desenvolveram tremores e desequilíbrio em 11dpi. A partir do 13dpi todos ficaram agitados e agressivos, embora um animal tenha mudado de comportamento do 18dpi, apresentando letargia e evoluindo ao óbito no dia posterior. Os cinco animais inoculados com  $10^5$  PFU apresentaram tremores, desequilíbrio e paralisia de membros posteriores a partir do 9dpi, letargia intensa e caquexia no 13dpi. Dois animais foram a óbito no dia 14dpi. Dos animais inoculados com a maior concentração de partículas virais ( $10^6$  PFU), um animal foi a óbito no 8dpi, antes mesmo de apresentar qualquer sinal. Os quatro restantes apresentaram tremores, desequilíbrio e paralisia de membros posteriores a partir do 9dpi, letargia intensa e

caquexia no 13dpi. Dois animais foram a óbito 13dpi e mais dois no 14dpi. Os animais que receberam  $10^3$  e  $10^4$  PFU evoluíram para uma melhora clínica. Já os sobreviventes dos grupos inoculados com  $10^5$  e  $10^6$  PFU, sofreram ponto final humanitário no 14dpi devido ao estado geral que se encontravam. (Figura 14).



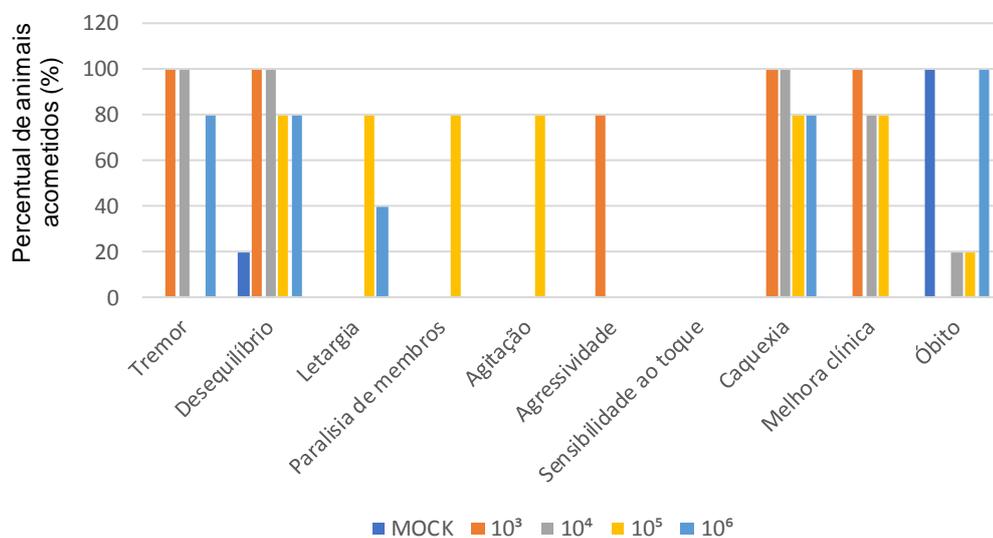
**Figura 14: Sinais Clínicos dos animais inoculados com a cepa asiática (AB).** Mock (n=10),  $10^3$ (n=5),  $10^4$ (n=5),  $10^5$ (n=5),  $10^6$ (n=5). Todos os camundongos WT Swiss webster destes ensaios foram inoculados em p3 (pós-nato 3 dias), via intraperitoneal (50 $\mu$ L) com as diferentes concentrações da cepa MR766, e avaliados diariamente no período da tarde.

### 6.3.3 Animais inoculados com a cepa Asiática do vírus da Zika (PE)

Um animal do controle apresentou desequilíbrio e agitação no 9dpi. Esse animal foi a óbito no 28dpi e outros quatro sofreram canibalismo da progenitora logo após serem manipulados no 0dpi. Todos os animais (n=5) que receberam  $10^3$  PFU da cepa PE apresentaram tremores, desenvolveram desequilíbrio e caquexia no 9dpi, porém, ao longo dos dias houve uma melhora desses sinais e no 18dpi, o grupo inteiro apresentava apenas um leve desequilíbrio. No 23dpi todos animais se encontravam em plena recuperação. Tal qual os animais inoculados com  $10^3$  PFU, os inoculados com  $10^4$  PFU (n=5) apresentaram tremores, desequilíbrio e caquexia no 9dpi. Um animal veio a óbito no 11dpi após ter sido observado separado do ninho. O grupo começou a apresentar sinais de recuperação no 19dpi que perdurou até o 23dpi. Um animal inoculado com  $10^5$  PFU, foi observado fora do ninho no 9dpi e foi a óbito em 12dpi. Os sobreviventes (n=4), desenvolveram agitação, paralisia de membros, desequilíbrio a partir de 9dpi. No 12dpi mostravam sinais de debilidade intensa,

caquéticos. Apesar da melhora clínica, e do ganho de peso, os animais demonstraram um aspecto debilitado e desenvolvimento inferior ao grupo controle.

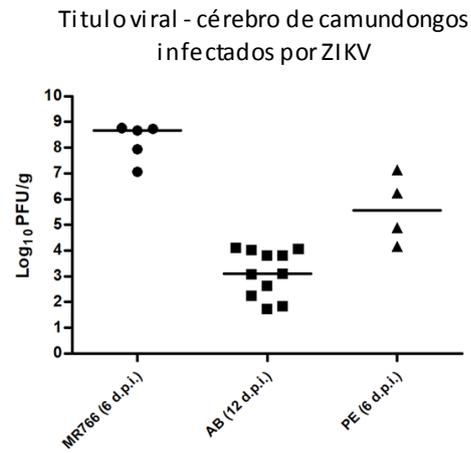
Os animais inoculados com  $10^6$  PFU, apresentaram os mesmos sinais clínicos dos grupos tratados com  $10^4$  e  $10^5$  PFU, tremores, desequilíbrio e caquexia no 9dpi em quatro dos cinco animais inoculados. Dois animais apresentaram letargia intensa no 11dpi e em 12dpi, três animais foram a óbito. Os dois animais restantes ficaram muito debilitados, agravando o quadro clínico e terminaram indo a óbito no 28dpi. (Figura 15).



**Figura 15: Sinais Clínicos dos animais inoculados com a cepa asiática (PE).** Mock ( $n=10$ ),  $10^3$  ( $n=5$ ),  $10^4$  ( $n=5$ ),  $10^5$  ( $n=5$ ),  $10^6$  ( $n=5$ ). Todos os camundongos WT Swiss webster destes ensaios foram inoculados em p3 (pós-nato 3 dias), via intraperitoneal ( $50\mu\text{L}$ ) com as diferentes concentrações da cepa MR766, e avaliados diariamente no período da tarde.

#### 6.4 Confirmação da presença do ZIKV nos tecidos cerebrais

Os tecidos cerebrais foram coletados e utilizados para confirmação da infecção, a fim de avaliar a replicação efetiva do ZIKV nestes órgãos. O sobrenadante de células tratadas previamente e infectadas por ZIKV, foi avaliado quanto à produção viral de partículas infecciosas pela contagem de placas de lise e cálculo de Unidades Formadoras de Placa (Titulação viral em placa – UFP/mL). Houve replicação viral no cérebro dos animais inoculados intraperitonealmente em p3 com as três diferentes cepas virais (MR766, AB e PE) na concentração de  $10^4$  PFU (Figura 16).



**Figura 16: Título viral - Cérebro de camundongos inoculados com ZIKV.** Animais infectados em p3 com  $10^4$  PFU, via intraperitoneal com as cepas virais MR766 (6dpi), AB (12dpi), PE (6dpi). Dados em  $\text{Log}_{10}$  de PFU por grama de tecido. \*Cada ponto é representativo de um animal. \*\*Em barra horizontal, consta a MEDIANA de cada grupo.

## 7. DISCUSSÃO

Em 2016, houve um intenso esforço da comunidade científica para entender a biologia do ZIKV e desenvolver modelos de infecção para o estudo da relação vírus hospedeiro, patogênese e teste de fármacos anti-virais. As diferenças na epidemiologia e na apresentação da doença durante os surtos levaram pesquisadores a desenvolver modelos animais de infecção por ZIKV usando diferentes cepas do vírus e vias de inoculação. Modelos animais têm sido estabelecidos para investigar mecanismos de disseminação, patogênese e resposta imune do hospedeiro a ZIKV em camundongos adultos, gestantes, fetos em desenvolvimento e neonatos.

A primeira cepa do ZIKV isolada (MR766, Uganda, 1947) foi passada em série no cérebro de camundongos. Após as passagens, o vírus tornou-se bem adaptado para camundongos e foi muito mais satisfatório para a reprodução dos estudos experimentais (DICK, 1952). A extensa história de passagem do ZIKV MR766 suscitou preocupação com a utilidade desta cepa e sua relação com isolados clínicos contemporâneos (MORRISON, 2016), visto que as cepas asiáticas não foram adaptadas aos camundongos e por esse motivo apresentam uma taxa de letalidade menor que a cepa africana quando inoculadas intraperitonealmente. No presente estudo, os camundongos infectados com as cepas asiáticas (AB e PE) não morreram precocemente, enquanto os animais infectados com a cepa africana vão a óbito no máximo em 6 dias. O estudo com as cepas asiáticas mostrou-se eficaz e satisfatório, visto que, os animais mostraram sinais clínicos característicos da doença e permitiram a avaliação das alterações neurológicas e comportamentais a longo prazo, durante processo de maturação do cérebro.

Muitos estudos utilizando diferentes modelos celulares e camundongos com *backgrounds* genéticos diversos, diferentes vias de infecção, cepas e uma variedade de carga virais têm sido úteis para o entendimento dos impactos causados pela infecção pelo ZIKV. A vantagem do um modelo heterogênico sobre os isogênicos ou os isogênicos modificados geneticamente é a mimetização da variabilidade genética da população humana, uma estratégia interessante no que diz respeito ao estudo de teste de fármacos e vacinas relacionadas a prevenção e cura da Zika.

Um dos primeiros experimentos em animais usando ZIKV da linhagem asiática, isolado do Brasil (ZIKVBR) demonstrou que a associação da infecção com as

alterações no desenvolvimento é dependente da linhagem do camundongo (CUGOLA et al., 2016).

A maior parte dos artigos publicados usam camundongos transgênicos *knockout* imunodeficientes por responderem de forma mais eficiente a infecção e conseqüentemente desenvolvem a doença de forma mais agressiva. Morrison et al. (2017) mostraram que camundongos transgênicos *knockout* em fundo 129 e, C57BL/6, inoculados via intravenosa, subcutânea ou intraperitoneal com as cepas africana (MR766 ou Dakar 1984), asiática (H / PF / 2013) ou americanas (Brasil Paraiba\_2015) do ZIKV desenvolveram graves sinais da doença, como fraqueza dos membros posteriores, paralisia e morte (MORRISON, 2017). Por outro lado, camundongos heterogênicos Swiss webster adultos quando infectados pelas vias intraperitoneal ou subcutânea não são susceptíveis, assim como os camundongos isogênicos C57BL/6 adultos (RAMOS DA SILVA, 2016; DICK, 1952). No entanto, no presente estudo, camundongos Swiss webster, neonatos com três dias de vida (p3), quando inoculados por via intraperitoneal, com as três diferentes cepas (MR766, AB e PE), apresentaram sinais clínicos da infecção condizentes com características neurotrópicas para a espécie. Esses dados corroboram com os resultados encontrados por Dick et al. (1952a), que utilizou a cepa MR766, nas concentrações de  $10^3$  a  $10^6$  PFU, em camundongos neonatos Swiss webster inoculados por via intracranial. Os animais demonstraram sinais clínicos da infecção culminando em 100% de mortalidade no 6dpi.

Dick et al. (1952b) também mostraram a pouca susceptibilidade de camundongos selvagens adultos à infecção intraperitoneal com o vírus, o que demonstra a capacidade do sistema imune desses animais de controlar a infecção. No entanto, camundongos selvagens com menos de 7 dias de vida foram susceptíveis à infecção. Manifestações como paralisia dos membros, tremores, letargia, perda de peso e morte têm sido observadas em diferentes modelos (transgênicos adultos e neonatos selvagens) de infecção por ZIKV em camundongos (ALIOTA et al., 2016; DOWALL et al., 2016; LAZEAR et al., 2016; ROSSI et al., 2016).

As vias de inoculação são estudadas com frequência nos artigos científicos. No presente trabalho a via intraperitoneal demonstrou ser eficaz, visto que, foram observados sinais clínicos característicos da doença, confirmada pela presença do vírus no tecido cerebral em todos os grupos experimentais.

Fernandes (2016) inoculou neonatos de Swiss webster via subcutânea e intracerebral com ZIKVBR. O grupo intracerebral (ICG) apresentou lesões cerebrais graves/severas, enquanto o grupo subcutâneo (SCG) apresentou lesões cerebrais moderadas. Souza et al. (2017), utilizando a mesma cepa na concentração de  $10^6$  PFU, mas pela via subcutânea em camundongos WT neonatos (p3) imunocompetentes, mostraram que o ZIKVBR atingiu e se replicou no cérebro, induzindo perda de peso e mortalidade. Em adição, realizaram acompanhamento a longo prazo das consequências comportamentais, neuropatológicas e moleculares da infecção nesses animais e mostraram atrofia cerebral, disfunção motora severa, episódios de convulsões, hipertonia, movimento distônico e postura curvada. Embora os animais adultos se recuperem, o vírus permanece ativamente replicando, e os animais mostram uma maior susceptibilidade a outras disfunções comportamentais severas como deficiências cognitiva e social. Os dados de Souza et al. (2017) corroboraram com os encontrados neste estudo, onde observamos que as cepas asiáticas (AB e PE) quando inoculadas intraperitonealmente, foram capazes de induzir inúmeros sinais clínicos, muitas vezes severos, sugerindo comprometimento do SNC, e ainda atingiu e replicou no cérebro dos neonatos Swiss webster. O mesmo foi observado com a cepa africana MR766.

Segundo Shao et al. (2016), é possível que a infecção do sistema nervoso ZIKV possa resultar em um efeito global na restrição de crescimento. Testes *in vitro* sugerem que a linhagem brasileira do vírus é mais agressiva do que a linhagem africana, que originalmente infectou macacos (DOWALL, 2017).

Observamos uma relação entre concentração de partículas virais e a perda de peso corporal quando os animais foram inoculados com a cepa MR766, visto que os grupos que receberam a concentração de  $10^3$  PFU não apresentaram perda de peso, enquanto que os animais inoculados com  $10^4$  PFU mantiveram ou ganharam peso durante o experimento. Já os animais infectados com a concentração de  $10^5$  e  $10^6$  PFU mantiveram ou perderam peso a partir do 4dpi, no entanto, independente da concentração inoculada, todos os animais apresentaram presença de sinais clínicos severos e foram a óbito no 6dpi. Observamos um aumento nas ocorrências dos sinais clínicos no 6dpi entre a concentração de partículas virais administradas, ou seja, o grupo que recebeu a maior concentração apresentou maior variabilidade dos sinais

clínicos. No entanto, esses sinais foram observados em um curto período de tempo pois todos os animais foram a óbito no mesmo dia do aparecimento dos sinais.

Tripathi et al. (2017), observaram que a cepa da linhagem africana (MR766) do ZIKV, quando inoculada subcutaneamente em camundongos transgênicos adultos (*knockout*) C57BL/6 Stat2<sup>-/-</sup> induzem episódios curtos de sintomas neurológicos graves, seguido de letalidade, quando comparados as cepas asiáticas, que manifestam sinais prolongados de mau funcionamento neural, causando ocasionalmente a morte (TRIPATHI et al., 2017). O mesmo artigo conclui que a cepa da linhagem africana induz níveis mais elevados de citocinas inflamatórias e marcadores associados à infiltração celular no cérebro dos camundongos infectados, o que pode explicar a patogênese exacerbada em comparação as cepas de linhagem asiática. Neste contexto, os sinais clínicos apresentados pelos animais inoculados com a cepa MR766 no presente trabalho, tais como: tremores, desequilíbrio, debilidade, letargia, paralisia de membros, progredindo a 100% de óbitos estaria associada à infiltração celular no cérebro.

Podemos relacionar esta informação quando analisamos os grupos que foram infectados com a cepa AB, no primeiro experimento não observamos perda de peso significativa em nenhuma das concentrações analisadas. Em contrapartida, no segundo experimento somente os animais inoculados com as concentrações maiores de partícula viral ( $10^5$  e  $10^6$  PFU) perderam peso de forma significativa. Essa perda foi superior a 20% de seus pesos iniciais e por isso sofreram ponto final humanitário no 14dpi. Apesar da variação quanto ao peso existente entre os experimentos, podemos observar que houve uma relação entre a concentração de partículas virais inoculadas e severidade dos sinais clínicos, onde observamos que quanto maior a concentração mais grave os danos neurológicos, entre eles: tremores, desequilíbrio e agressividade, letargia, paralisia dos membros e caquexia. O grupo que recebeu  $10^6$  PFU, 100% dos animais inoculados progrediram ao óbito, enquanto, o grupo que recebeu concentrações menores ( $10^3$  e  $10^4$  PFU) apresentaram melhora clínica. Essa melhora de certa forma é satisfatória, pois permite que esses animais sejam estudados por um período de tempo maior, visto que, apresentaram taxa de sobrevivência mais alta e sinais clínicos característicos da doença com perda de peso significativo, sem comprometer o bem-estar do animal.

Resultados semelhantes foram descritos por Fernandes et al. (2017) usando as mesmas concentrações de partículas virais em neonatos Swiss webster, mas por vias de administração diferentes, subcutânea (SCG) e intracerebral (ICG). Eles concluíram que manifestações neurológicas durante um período de tempo mais longo, parece ser um modelo melhor para o estudo da patogênese da infecção por ZIKV.

Os animais inoculados com a cepa PE na concentração de  $10^3$  PFU não apresentaram perda de peso, mas foram observados sinais clínicos da patologia, embora os animais não tenham evoluído ao óbito e por isso, sofreram ponto final humanitário ao término dos experimentos. Já os animais inoculados com  $10^4$  PFU, apresentaram resultados diferentes nos dois experimentos. No primeiro, os animais perderam peso significativo quando comparado ao grupo controle, enquanto que no segundo experimento o grupo se desenvolveu normalmente. Essa variação também ocorreu em relação à taxa de sobrevivência, que foi mais baixa no primeiro experimento. Todos os animais inoculados com  $10^4$  PFU apresentaram sinais clínicos da doença ao longo do experimento, mas se recuperaram, corroborando com o trabalho publicado por Souza et al. (2017), onde inocularam via subcutânea a cepa ZIKVBR em camundongos Swiss webster neonatos.

O grupo que recebeu  $10^5$  PFU também apresentou resultados diferentes relacionados ao peso. No primeiro experimento houve ganho de peso, e apesar de não ter sido observado perda de peso significativa no segundo experimento, foi o grupo que menos se desenvolveu. Os dois experimentos apresentaram similares taxas de sobrevivência decorrentes da infecção. Todos os animais do grupo apresentaram sinais clínicos, mas não foi observado nenhum sinal de recuperação.

No primeiro experimento os animais inoculados com  $10^6$  PFU com a cepa PE apresentaram curva de peso bem semelhante ao do grupo controle, e não foi observado nenhuma perda de peso. Já no segundo experimento, o grupo perdeu peso e se desenvolveu de maneira retardada ao longo do experimento. A taxa de sobrevivência no primeiro experimento foi maior que 80%, enquanto que no segundo apenas um animal sobreviveu, após todo o grupo apresentar intensos sinais clínicos da patologia. A infecção por ZIKV em camundongos neonatos WT, nos quais um subconjunto sobrevive pode permitir a avaliação do desenvolvimento neurológico a longo prazo e sequelas comportamentais associadas à infecção por ZIKV do cérebro em maturação (FERNANDES, 2017).

Analisando os dados de morbidade e mortalidade dos grupos estudados, associados ao bem estar animal, podemos concluir que a melhor concentração de partículas virais é de  $10^4$  PFU. Quando avaliamos os dados de peso nos animais infectados com a cepa AB, não observamos perda de peso significativa em nenhuma das concentrações administradas no primeiro experimento, apenas no segundo, onde fica claro a relação inversamente proporcional, ou seja, quanto mais alta a concentração de partículas virais inoculadas, menor o peso alcançado pelo animal. O mesmo ocorreu com a cepa PE, onde apenas no segundo experimento foi possível observar perda de peso significativa nos animais inoculados com as maiores concentrações. Devido à grande perda de peso, mais de 20%, nas concentrações maiores de  $10^5$  e  $10^6$  PFU das cepas asiáticas, os animais sofreram ponto final humanitário devido ao grande sofrimento.

Quando analisamos a concentração de  $10^4$  PFU nas duas cepas asiáticas a taxa de sobrevivência é muito alta e a perda de peso não é significativa. Entretanto, os sinais clínicos da doença já estão presentes o que possibilita a caracterização da patogenia nesse grupo. Além da taxa de sobrevivência ser maior nessa concentração, os animais obtiveram uma melhora clínica após apresentarem sinais clássicos da infecção por ZIKV como tremores, desequilíbrio e paralisia de membros posteriores.

Para o sucesso do experimento, ficou claro que a melhor resposta seria a do grupo experimental que apresentasse a maior taxa de sobrevivência para que os animais pudessem ser analisados na sua totalidade. Contudo, seguindo as diretrizes dos 3 R's, que preconiza que não haja sofrimento animal. Nesse contexto, a taxa de sobrevivência é de suma importância quando analisada conjuntamente ao bem-estar animal.

Assim como Tripathi et al. (2017), observamos que as cepas africanas de ZIKV induzem episódios curtos de sintomas neurológicos graves seguido pela letalidade. Em comparação, cepas asiáticas manifestam sinais neurológicos, causando ocasionalmente a morte. A infecção intraperitoneal por ZIKV em camundongos WT neonatal, nos quais um subconjunto sobrevive, embora apresente sinais clínicos e o mínimo de bem-estar, podem permitir a avaliação do desenvolvimento neurológico em longo prazo e sequelas comportamentais associadas à infecção por ZIKV do cérebro em maturação.

## 8. CONCLUSÕES

- As quatro concentrações de partículas virais ( $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  PFU) das três diferentes cepas MR766, AB e PE foram capazes de provocar a infecção nos neonatos Swiss Webster quando inoculados intraperitonealmente com 3 dia de vida (p3), caracterizada pelos sinais clínicos, taxa de sobrevivência e curva de peso.
- A via intraperitoneal demonstrou ser eficaz, visto que foi observada a presença do vírus no tecido cerebral, tornando um modelo satisfatório para estudo da patogênese do vírus em tecido animal.
- A infecção pelo ZIKV pelas três cepas induz a perda de peso e mortalidade, assim como inúmeros sinais clínicos, muitas vezes severos, sugerindo comprometimento do SNC.
- Através do uso crescente de partículas virais e aferição de peso e taxa de sobrevivência, demonstramos que  $10^4$  PFU, nas três diferentes cepas, é uma concentração adequada para observação clínica a longo prazo, visto que os animais mostram sinais clínicos característicos da doença com menor sofrimento e podem permitir a avaliação do desenvolvimento neurológico e sequelas comportamentais associadas à infecção por ZIKV do cérebro em maturação, enquanto que a concentração de  $10^5$  PFU parece ser mais eficaz à aplicação de ensaios com fármacos, visto que os animais desenvolvem a doença de forma aguda.
- Foi estabelecido um modelo viável de infecção do ZIKV em camundongos Swiss webster neonatos (p3) imunocompetente, fundamental para compreender a patologia do ZIKV, assim como contribuir nos avanços das pesquisas relacionadas à prevenção e cura da Zika, como a produção de fármacos e vacinas.

## 9. REFERÊNCIAS

- ALIOTA, Matthew T. et al. Characterization of lethal Zika virus infection in AG129 mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004682, 2016. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004682>> Acesso em: 12 fevereiro 2017.
- ARAUJO, Abelardo QC. at al. Zika virus-associated neurological disorders: a review. **Brain**, v. 139, n. 8, p. 2122-2130, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/article/139/8/2122/1754016>> Acesso em: 15 agosto 2016
- ASHOUR, Joseph et al. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **Journal of virology**, v. 83, n. 11, p. 5408-5418, 2009. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/content/83/11/5408.short>> Acesso em: 25 novembro 2017.
- BAHIA SdS. **Panorama na Bahia**. Dengue, Chikungunya e Zika. 6 de julho de 2015. Disponível em: <[http://www.saude.ba.gov.br/novoportal/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9497:panorama-bahia&catid=98:dengue-zika-chikungunya-e-sgb4](http://www.saude.ba.gov.br/novoportal/index.php?option=com_content&view=article&id=9497:panorama-bahia&catid=98:dengue-zika-chikungunya-e-sgb4)> Acesso em: 19 fevereiro 2016.
- BARCELLOS, Christovam et al. Increased hospitalizations for neuropathies as indicators of Zika virus infection, according to Health Information System Data, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 11, p. 1894, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5088029/>> Acesso em: 27 novembro 2017.
- BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro surveill**, v. 19, n. 13, p. 20751, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721538>> Acesso em: 25 novembro 2017.
- BRASIL, Patrícia et al. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. **The lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1482, 2016. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(16\)30058-7/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(16)30058-7/abstract)> Acesso em: 25 novembro 2017.
- BRASIL. Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil até a semana Epidemiológica 51/2015. **Boletim Epidemiológico 2016**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/11/2015-053-para-substituir-na-pagina.pdf>> Acesso em: 13 outubro 2016.
- BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue, chikungunya e zika até a Semana Epidemiológica 35/2017. **Boletim Epidemiológico (SE) 35/2017**. Disponível em: <<https://rededengue.fiocruz.br/numeros/626-monitoramento-dos-casos-de-dengue-chikungunya-e-zika-ate-a-semana-epidemiologica-35-2017>> Acesso em: 08 dezembro 2017.
- BRASIL. Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. **Resolução Normativa Nº 13, de 20 de setembro de 2013**. Diretrizes da Prática de . Disponível em: <[http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes\\_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-13-de-20.09.2013-D.O.U.-de-26.09.2012-Secao-I-Pag.-5.pdf](http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-13-de-20.09.2013-D.O.U.-de-26.09.2012-Secao-I-Pag.-5.pdf)> Acesso em: 22 dezembro 2017.
- BUTLER, Declan. First Zika-linked birth defects detected in Colombia. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/news/first-zika-linked-birth-defects-detected-in-colombia-1.19502>> Acesso em: 13 junho 2016.
- CALVET, Guilherme et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 6, p. 653-660, 2016.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309916000955>> Acesso em: 6 agosto 2016.

CAO-LORMEAU, Van-Mai et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673616005626>> Acesso em: 6 agosto 2016.

CARTEAUX, Guillaume et al. Zika virus associated with meningoencephalitis. **New England Journal of medicine**, v. 374, n. 16, p. 1595-1596, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc1602964#t=article>> Acesso em: 10 agosto 2017

CUGOLA, Fernanda R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267-271, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/vnfv/ncurrent/full/nature18296.html>> Acesso em: 13 maio 2016.

CULJAT, Marko et al. Clinical and imaging findings in an infant with Zika embryopathy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 6, p. 805-811, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/63/6/805/2389087>> Acesso em: 13 dezembro 2016.

DAVIDSON, Alexander. Suspected female-to-male sexual transmission of Zika virus—New York City, 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, 2016. Disponível em: <<https://espanol.cdc.gov/enes/mmwr/volumes/65/wr/mm6528e2.htm?mobile=nocontent>> Acesso em: 09 agosto 2017.

D'ANGELO, M. et al. Avaliação de sensibilidade de zigotos murinos ao herpesvírus bovino-1: um modelo experimental para estudos de interações embrião-vírus. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 141-145, 2005. Disponível em: < Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V72\\_2/dangelo.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V72_2/dangelo.PDF)> Acesso em: 21 outubro 2017.

DECKARD, D. Trew. Male-to-male sexual transmission of Zika virus—Texas, January 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, 2016. Disponível em: <<https://espanol.cdc.gov/enes/mmwr/volumes/65/wr/mm6514a3.htm?mobile=nocontent>> Acesso em: 09 agosto 2017.

DE PAULA FREITAS, Bruno et al. Ocular findings in infants with microcephaly associated with presumed Zika virus congenital infection in Salvador, Brazil. **JAMA ophthalmology**, v. 134, n. 5, p. 529-535, 2016. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamaophthalmology/fullarticle/2491896?version=meter%20at%201&module=meterLinks&pgtype=article&contentId=&mediald=&referrer=https://www.google.com/&priority=true&action=click&contentCollection=meter-links-click>> Acesso em: 02 janeiro 2016.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0035920352900424>> Acesso em: 09 agosto 2016.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952a. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0035920352900424>> Acesso em: 20 dezembro 2017

DICK, G. W. A. et al. Zika Virus (II). Pathogenicity and physical Properties. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 5, 1952b. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19541000391>> Acesso em: 09 agosto 2016.

DRIGGERS, Rita W. et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. **New England Journal of medicine**, v. 374, n. 22, p. 2142-2151, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1601824#t=article>> Acesso em: 8 dezembro 2017.

DOS REIS, Raquel Pitchon dos. Aumento dos casos de microcefalia no Brasil. 2015. Disponível em: <<http://www.rmmg.org/artigo/detalhes/1848>>. Acesso em: 22 abril 2016.

DOWALL, Stuart D. et al. A susceptible mouse model for Zika virus infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004658, 2016. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004658>> Acesso em: 22 julho 2016.

DUFFY, Mark R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. **New England Journal of medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0805715#t=article>> Acesso em: 22 julho 2017.

FANTINATO, Francieli Fontana Sutile Tardetti et al. Descrição dos primeiros casos de febre pelo vírus Zika investigados em municípios da região Nordeste do Brasil, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, n. ahead, p. 0-0, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/pdf/ress/2016nahead/2237-9622-ress-S1679\\_49742016000400002.pdf](http://www.scielo.br/pdf/ress/2016nahead/2237-9622-ress-S1679_49742016000400002.pdf)> Acesso em: 05 janeiro 2017.

FAHEY, James R. et al. The case for genetic monitoring of mice and rats used in biomedical research. **Mammalian genome**, v. 24, n. 3-4, p. 89-94, 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00335-012-9444-9>>. Acesso em: 22 abril 2016.

FAYE, Oumar et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002636>> Acesso em: 13 maio 2016.

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

FESTING, Michael F. Genetic monitoring of laboratory mouse colonies in the Medical Research Council Accreditation Scheme for the suppliers of laboratory animals. **Laboratory animals**, v. 8, n. 3, p. 291-299, 1974. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1258/002367774780943689>>. Acesso em: 22 abril 2016.

GOEIJENBIER, Marco et al. Zika virus and the current outbreak: an overview. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 74, n. 3, p. 104-9, 2016. Disponível em: <<http://www.njmonline.nl/getpdf.php?t=i&id=192#page=6>> Acesso em: 13 maio 2016.

GONZÁLEZ, FHD. et al. Perfil bioquímico sangüíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2001. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/29-1/29-1-502.pdf>> Acesso em: 12 janeiro 2018.

GOODFELLOW, Forrest T. et al. Zika virus induced mortality and microcephaly in chicken embryos. **Stem cells and development**, v. 25, n. 22, p. 1691-1697, 2016. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2016.0231>> Acesso em: 11 outubro 2017.

HADDOW, Andrew D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001477>> Acesso em: 11 outubro 2017.

KINDHAUSER, Mary Kay et al. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 9, p. 675-686C, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/bulletin/volumes/94/9/16-171082.pdf>> Acesso em: 11 outubro 2017.

LAZEAR, Helen M. et al. A mouse model of Zika virus pathogenesis. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 5, p. 720-730, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312816301020>> Acesso em: 09 agosto 2017.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139-145, 1954. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0035920354900061>> Acesso em: 10 novembro 2017.

MALTA, Juliane Maria Alves Siqueira et al. Síndrome de Guillain-Barré e outras manifestações neurológicas possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika em municípios da Bahia, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 26, 2017. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2237-96222017000100009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222017000100009&lng=en&nrm=iso)> Acesso em: 08 dezembro 2017.

MARTINES, Roosecelis Brasil. Notes from the field: evidence of Zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses—Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, 2016. Disponível em: <[https://espanol.cdc.gov/enes/mmwr/volumes/65/wr/mm6506e1.htm?s\\_cid=mm6506e1\\_w&mobile=nocontent](https://espanol.cdc.gov/enes/mmwr/volumes/65/wr/mm6506e1.htm?s_cid=mm6506e1_w&mobile=nocontent)> Acesso em: 10 novembro 2017.

MINER, Jonathan J. et al. Zika virus infection in mice causes panuveitis with shedding of virus in tears. **Cell reports**, v. 16, n. 12, p. 3208-3218, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124716311755t>> Acesso em: 10 maio 2017.

MLAKAR, Jernej et al. Zika virus associated with microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 2016, n. 374, p. 951-958, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1600651?af=R&rss=currentIssue#t=article>> Acesso em: 30 maio 2016.

MLACKER, Stephanie et al. Origin of the Zika virus revealed: a historical journey across the world. **International journal of dermatology**, v. 55, n. 12, p. 1369-1372, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27650823>> Acesso em 02 dezembro 2017.

MORRISON, Chris. DNA vaccines against Zika virus speed into clinical trials. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, p. 521, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrd.2016.159.pdf?origin=ppub>> Acesso em: 08 dezembro 2017.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 14, p. 20761, 2014. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761?TRACK=RSS>> Acesso em: 06 junho 2017.

MUSSO, Didier et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 359, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313657/>> Acesso em: 06 junhos 2017.

NORONHA, Lucia de et al. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 287-293, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762016005006103&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762016005006103&script=sci_arttext)> Acesso em: 22 outubro 2016.

OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6-7, 2016. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/uog.15831/full>> Acesso em: 10 fevereiro 2016.

Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS). **Zika Epidemiological Update**. 2017. Disponível em: <[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4981:aumento-de-sindrome-de-guillain-barre-e-anomalias-congenitas-em-areas-com-zika-leva-opas-oms-a-enviar-atualizacao-epidemiologica&Itemid=812](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=4981:aumento-de-sindrome-de-guillain-barre-e-anomalias-congenitas-em-areas-com-zika-leva-opas-oms-a-enviar-atualizacao-epidemiologica&Itemid=812)> Acesso em: 08 dezembro 2017.

POILEY, S. M. Methods and equipment used for cleaning and sanitizing animal care equipment at the National Institutes of Health. In: **Proc. Anim. Care Panel**. 1960. p. 129-142. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761?TRACK=RSS>> Acesso em: 06 junho 2017.

QUICKE, Kendra M. et al. Zika virus infects human placental macrophages. **Cell host & microbe**, v. 20, n. 1, p. 83-90, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312816302116>> Acesso em: 20 julho 2016.

RAMOS DA SILVA, Suzane; GAO, Shou-Jiang. Zika virus update II: Recent development of animal models—Proofs of association with human pathogenesis. **Journal of medical virology**, v. 88, n. 10, p. 1657-1658, 2016. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.24582/full>> Acesso em: 29 julho 2017.

ŞAHINER, F. Global spread of Zika virus epidemic: current knowledges and uncertainties. **Mikrobiyoloji bulteni**, v. 50, n. 2, p. 333-351, 2016. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/27175508>> Acesso em: 05 abril 2017.

SEMPLE, Bridgette D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in neurobiology**, v. 106, p. 1-16, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008213000300>> Acesso em: 8 dezembro 2017.

SHAO, Qiang et al. Zika virus infection disrupts neurovascular development and results in postnatal microcephaly with brain damage. **Development**, v. 143, n. 22, p. 4127-4136, 2016. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/27175508>> Acesso em: 11 maio 2017.

SIKKA, Veronica et al. The emergence of Zika virus as a global health security threat: a review and a consensus statement of the INDUSEM Joint Working Group (JWG). **Journal of global infectious diseases**, v. 8, n. 1, p. 3, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4785754/>> Acesso em: 19 junho 2017.

SOUZA, Isis NO et al. Neonatal Zika virus infection causes epileptic seizures, viral persistence and long-term behavioral impairment. **bioRxiv**, p. 195172, 2017. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/early/2017/09/28/195172>> Acesso em 9 dezembro 2017.

TRIPATHI, Shashank et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 3, p. e1006258, 2017. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plospathogens/article?rev=1&id=10.1371/journal.ppat.1006258>> Acesso em: 20 dezembro 2017

TROIANO, Juan Carlos; GOULD, Eduardo G.; GOULD, Ignacio. Hematological reference intervals in argentine lizard *Tupinambis merianae* (Sauria—Teiidae). **Comparative Clinical Pathology**, v. 17, n. 2, p. 93, 2008. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00580-007-0715-x>> Acesso em: 12 janeiro 2018.

VENTURA, Camila V. et al. Zika: neurological and ocular findings in infant without microcephaly. **The Lancet**, v. 387, n. 10037, p. 2502, 2016. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(16\)30776-0/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(16)30776-0/fulltext)> Acesso em: 19 abril 2016

WHO Emergencies preparedness, response. Guillain-Barre´ syndrome – Colombia and Venezuela. 2016b. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/don/12-february-2016-gbs-colombia-venezuela/en/4>> Acesso em: 19 abril 2016.

WIKAN, Nitwara; SMITH, Duncan R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. **The Lancet Infectious diseases**, v. 16, n. 7, p. e119-e126, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147330991630010X>> Acesso em: 30 junho 2017.

WILLISON, Hugh J.; JACOBS, Bart C.; VAN DOORN, Pieter A. Guillain-Barré syndrome. **The Lancet**, v. 388, n. 10045, p. 717-727, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673616003391>> Acesso em: 02 fevereiro 2016.

WU, Yanhua et al. A unique case of human Zika virus infection in association with severe liver injury and coagulation disorders. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11393, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-11568-4>> Acesso em: 30 junho 2017.

YOCKEY, Laura J. et al. Vaginal exposure to Zika virus during pregnancy leads to fetal brain infection. **Cell**, v. 166, n. 5, p. 1247-1256. e4, 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416310534>> Acesso em: 12 outubro 2016.

YUN, Sang-Im; LEE, Young-Min. Zika virus: An emerging flavivirus. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 204-219, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-017-7063-6>> Acesso em: 07 março 2017.

## ANEXO 1

## Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ**  
**Centro de Ciências da Saúde - CCS**

Rio de Janeiro, 27 de julho de 2017

Prezada Professora Loraine Campanati Araujo de Andrade

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Patogênese da infecção pelo vírus Zika em camundongos neonatos.”**, protocolo nº 077/17, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia 26/07/2017.

<b>Finalidade</b>	<b>( ) Ensino (X) Pesquisa Científica</b>
<b>Vigência do Projeto</b>	<b>Até 27/07/2018</b>
<b>Espécie/linhagem</b>	<b><i>Mus musculus/ Swiss</i></b>
<b>Nº de animais</b>	<b>231 animais (21 adultos e 210 filhotes)</b>
<b>Peso/idade</b>	<b>1-30g / p1-p3 e suas genitoras</b>
<b>Sexo</b>	<b>Machos e fêmeas</b>
<b>Origem</b>	<b>Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - ICTB - Fiocruz</b>

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat  
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS