

Ministério da Saúde

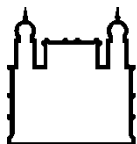
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e**  
**Molecular**

***LAUANA RIBAS TORRES***

**Infecção pelo vírus Zika de cultura de explantes e células primárias de  
placenta humana associada a terapia antiviral**

**RIO DE JANEIRO**  
**2018**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***LAUANA RIBAS TORRES***

**Infecção pelo vírus Zika de cultura de explantes e células primárias de  
placenta humana associada a terapia antiviral**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em *Ciências* - Biologia Celular e  
Molecular.

**Orientador:** Dr<sup>a</sup>. Elen Mello de Souza

**RIO DE JANEIRO**  
**2018**

Ribas Torres, Lauana.

Infecção pelo vírus Zika de cultura de explantes e células primárias de placenta humana associada a terapia antiviral / Lauana Ribas Torres. - Rio de Janeiro, 2018.

119 f.

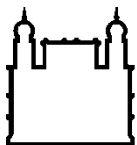
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Elen Mello de Souza.

Bibliografia: f. 97-106

1. Placenta humana. 2. Vírus Zika. 3. Células primárias. 4. Cultivo de explantes. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***LAUANA RIBAS TORRES***

**Infecção pelo vírus Zika de cultura de explantes e células primárias de  
placenta humana associada a terapia antiviral**

**Orientador:** Dra. Elen Mello de Souza

Aprovada em:

**EXAMINADORES:**

Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto (IOC/FIOCRUZ) - Presidente /Revisor

Dr. Marcelo Einicker Lamas- (UFRJ) - Membro/Externo

Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso (IOC/FIOCRUZ) - Membro

Dr. Luiz Carlos da Silva Pinheiro – (Farmanguinhos/FIOCRUZ) - Suplente/Externo

Dra. Luciana Garzoni (IOC/FIOCRUZ) – Suplente

Rio de Janeiro, 27 de setembro de 2018.

“Somos o que repetidamente fazemos. A excelência, portanto, não é um feito, mas um hábito” (Aristóteles)

## Agradecimentos

Gostaria de expressar minha gratidão primeiramente a Deus, por colocar em meu coração que esse sonho era possível e por me capacitar para realizá-lo. Senhor, eu te agradeço por cada etapa vencida, por cada porta que se abriu e, sobretudo, por todas as conquistas alcançadas.

Agradeço a toda minha família, em especial minha mãe, pelo auxílio no cotidiano para que eu pudesse realizar essa pós-graduação. Mãe, sem seu apoio eu jamais conseguiria concluir essa dissertação, aliás, nem mesmo teria concluído a graduação. Obrigada por ter confiado em mim, por ter me apoiado e por toda ajuda com o nosso Caio. Jamais me esquecerei do que fez e faz por mim.

Ao meu namorado Igor Diller, pela parceria, cumplicidade, pelo apoio, por acreditar em mim, pela paciência e principalmente por me incentivar a lutar pelos meus sonhos. Agradeço por caminhar ao meu lado, por sonhar e realizar junto comigo. Você é um presente de Deus na minha vida.

Ao Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral.

À minha orientadora Dra. Elen Mello, pela oportunidade, pela confiança e por todo conhecimento transmitido. Agradeço muito a Deus por colocar uma orientadora tão dedicada e paciente em meu caminho. Elen, você para mim é referência de honestidade, perseverança, comprometimento e caráter. Obrigada por me fazer crescer, por me mostrar o caminho para vencer e por nunca abandonar seus alunos rs! Você é mais que uma orientadora, é uma mãezona da ciência!

À doutoranda Audrien Andrade, por ser minha amiga e colaboradora desde a iniciação científica, por toda parceria, paciência, e ajuda em todos os experimentos realizados. Audrien, muito obrigada por ter contribuído tanto para minha formação e por ter sido uma amiga. Foram muitos momentos de alegria e desespero compartilhados no laboratório.

Ao Instituto Fernandes Figueira, e a toda equipe do Depto. de Anat. Patológica e Citopatologia por todo apoio financeiro, sem o qual não seria possível desenvolver essa dissertação, e pelo empréstimo de equipamentos. Em especial ao Dr. Marcelo Meuser pela colaboração com o estabelecimento das culturas de placenta e análise dos resultados. Obrigada por ter embarcado nessa conosco e por todo auxílio.

A Dra. Ana Bispo, chefe do Lab. de referência em Flavivírus do IOC, pelo fornecimento da cepa brasileira do vírus Zika.

A Dra. Marcia Arissawa do Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (LATAM) de Bio-Manguinhos, pelo fornecimento do anticorpo monoclonal anti-Flavivirus 4G-2.

Ao Dr. José Junior, do Lab. de Virologia Molecular, que desde nossa chegada à virologia tem nos apoiado e se tornou nosso parceiro e colaborador.

A Dra. Dinair Couto-Lima pelo fornecimento da célula C6/36 e por toda disponibilidade de ensinamento na área.

A Dra. Mariana Waghbi pelo fornecimento de vários reagentes e material de cultura, e por todo seu apoio incondicional!!!

Ao Dr. Daniel Adesse pelo fornecimento de anticorpo secundário e pelo tempo de aprendizado em seu laboratório.

A Dra. Helene dos Santos Barbosa que muito gentilmente aceitou colaborar com a execução do nosso trabalho e pela excelência da análise dos resultados de Microscopia Eletrônica de Transmissão, que não teria feito parte deste trabalho sem o aceite desse desafio aos 45 minutos do segundo tempo. Muito Obrigada!

A Dra. Luzia por ter aceitado revisar este trabalho com tanto carinho!

A Equipe do Laboratório da Dra. Patricia Bozza, que tornou disponível o uso do microscópio de fluorescência, mesmo atas horas da noite, e sempre nos auxiliando com tanta boa vontade.

A toda equipe do Laboratório de Virologia que nos acolheu com tanta gentileza e motivação para seguirmos na caminhada científica.

Também gostaria de agradecer aos amigos que sempre estiveram ao meu lado com palavras de carinho, incentivo e motivação. Ane, Julie, Danielle, Luana, Dani, e em especial, Ana Jéssica Miranda, que me enconrou a estudar, buscar a pós-graduação, me confiou e aqui estou hoje. Obrigada por ser essa amiga-irmã! E por fim agradeço ao apoio financeiro dos fomentos CAPES e FIOCRUZ.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Infecção pelo vírus Zika de cultura de explantes e células primárias de**  
**placenta humana associada a terapia antiviral**

LAUANA RIBAS TORRES

**RESUMO**

Em 2015, houve um surto da febre do Zika no Brasil e de nascimento de natimorto/bebês com microcefalia e outras desordens neurológicas de mães que foram acometidas pela infecção, levando a associação entre ZIKV e síndrome congênita. Não está claro como o vírus alcança o feto, mas a placenta representa uma importante rota de transmissão, desde que o vírus foi detectado em placentas de mulheres infectadas e de infecções experimentais *in vivo* e *in vitro*. Além desta lacuna no conhecimento da transmissão, ainda não existe tratamento profilático e/ou terapêutico específico para pacientes e, em especial para gestantes infectadas. Desta forma, o objetivo do trabalho foi implementar o cultivo primário de explantes e células de placenta humana a termo, a fim de investigar a susceptibilidade e o perfil de infecção pelo ZIKV *ex vivo*, e utilizar este modelo experimental para investigar, no contexto de reposicionamento de drogas, a atividade antiviral do fármaco Nitazoxanida (NTZ). Para isto, foi utilizada a membrana fetal e vilosidade coriônica, marcadas por anticorpos característicos para fenotipagem de células placentárias, como a citoqueratina-7 (CK-7) em células epiteliais e vimentina que exclui este tipo celular. Foi observado que os explantes em cultivo apresentaram integridade morfológica, estrutural e fenótipo característicos. A membrana e vilosidade coriônica foram susceptíveis a infecção, sendo que nas vilosidades a infecção ocorreu somente em células vimentina+. O isolamento das células da membrana fetal revelou maior rendimento e viabilidade das células amnióticas comparada às coriônicas. As células amnióticas mantêm sua homogeneidade morfológica e fenotípica CK-7+ em 98% da cultura, enquanto, as coriônicas apresentam uma cultura mista variando de 72% a 28% de células CK-7+, de acordo com o rendimento de sua obtenção, podendo atingir 100% de vimentina+ ao longo do cultivo. O isolamento das células das vilosidades coriônicas foi realizado a partir de explantes que se reorganizaram em esferóides formados por cerca de 30% de células CK-7+ e 60% vimentina+, embora em perfis diferentes, as células proliferativas que formaram a monocamada foram susceptíveis a infecção, esses resultados necessitam ser melhor explorados. Quando células amnióticas e coriônicas vimentina+ e CK+ foram infectadas com baixa multiplicidade de infecção (MOI 1) em diferentes tempos, os resultados demonstraram que amnion CK-7+ foram mais susceptíveis. Empregando alta carga viral (MOI 10 e 20) na cinética de infecção de células coriônicas foram observados elevados percentuais de infecção tempo-dependente (17% a 80%), porém, quando comparada a infecção com MOI 20 por 48h de células coriônicas vimentina + e CK-7+ os percentuais alcançados foram cerca de 56% e 77%, respectivamente, demonstrando que células CK+ foram mais susceptíveis a infecção. A análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão das células coriônicas não infectadas demonstrou preservação ultraestrutural. No entanto, a infecção destas células levou a importantes alterações ultraestruturais, especialmente alargamento e formação de estruturas de membrana no retículo endoplasmático, com presença de partículas virais. Importaneamente, foi determinada a atividade antiviral do fármaco Nitazoxanida sobre culturas de células coriônicas CK+ infectadas com alta carga viral (MOI 20) por 48h, avaliando redução de células infectadas por detecção antigênica, redução do efeito citopático por ensaio de plaque e redução de carga viral por RT-qPCR. Foi observado que a concentração de 50 µg/mL do fármaco levou a redução de 79% de células infectadas, 100% do efeito citopático e cerca de 93% do número de cópias de RNA viral/mL no sobrenadante das culturas tratadas. Com o desenvolvimento deste trabalho, reforçamos que este modelo experimental representa uma excelente ferramenta para explorar aspectos biológicos da transmissão congênita pelo ZIKV e identificar moléculas antivirais, incluindo reposicionamento de drogas, especialmente para o tratamento de gestantes infectadas.



**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Infection of primary human placental cells and explants by ZIKV associated**  
**with antiviral therapy**

*LAUANA RIBAS TORRES*

**ABSTRACT**

In 2015, there was an outbreak of Zika fever in Brazil and birth of stillbirth / infants with microcephaly and other neurological disorders of mothers who were affected by the infection, leading to the association between ZIKV and congenital syndrome. It is unclear how the virus reaches the fetus, but the placenta represents an important route of transmission since the virus was detected in placentas of infected women and experimental infections *in vivo* and *in vitro*. Besides this lack of knowledge of the transmission, there is still no specific prophylactic and / or therapeutic treatment for patients and, especially for infected pregnant women. In order to investigate the susceptibility and profile of infection by ZIKV *ex vivo*, and to use this experimental model to investigate, in the context of repositioning of drugs, the antiviral activity of the drug Nitazoxanide (NTZ). For this, the fetal membrane and chorionic villi were used, marked by antibodies characteristic for phenotyping of placental cells, such as cytokeratin-7 (CK-7) in epithelial cells and vimentin that excludes this cell type. It did observed that the explants in culture showed characteristic morphological, structural and phenotypic integrity. Chorionic membrane and villi were susceptible to infection, but the infection in the villi only occurred in vimentin+ cells. Isolation of fetal membrane cells revealed higher yield and viability of amniotic cells compared to chorionic. Amniotic cells maintain their morphological and phenotypic CK-7+ homogeneity in 98% of the culture, while the chorionic cultures show a mixed culture ranging from 72% to 28% of CK-7+ cells, according to their yield, reaching 100% vimentin+ throughout the culture. Isolation of chorionic villus cells was performed from explants that reorganized into spheroids formed by about 30% CK-7+ cells and 60% vimentin+, although in different profiles, the proliferative cells that formed the monolayer were susceptible to infection, these results need to be better explored. When amniotic and chorionic vimentin+ and CK+ cells were infected with low multiplicity of infection (MOI 1) at different times, the results demonstrated that amnion CK-7+ were more susceptible. Using a high viral load (MOI 10 and 20) in infection kinetics of chorionic cells, high percentages of time-dependent infection were observed (17% to 80%), however, when compared to infection with MOI 20 for 48h of vimentin+ and CK-7+ chorionic cells the percentages reached were about 56% and 77%, respectively, demonstrating that CK+ cells were more susceptible to infection. Transmission Electron Microscopy analysis of uninfected chorionic cells demonstrated ultrastructural preservation. However, infection of these cells led to important ultrastructural changes, especially enlargement and formation of membrane structures in the endoplasmic reticulum, with the presence of viral particles. Importantly, antiviral activity of the drug NTZ was determined on cultures of CK+ chorionic cells infected with high viral load (MOI 20) for 48h, evaluating reduction of infected cells by antigenic detection, reduction of cytopathic effect by plaque assay and reduction of viral load by RT-qPCR. It did observed that the concentration of 50 µg/mL of the drug led to the reduction of 79% of infected cells, 100% of the cytopathic effect and about 93% of the number of viral RNA copies / ml in the supernatant of the treated cultures. With the development of this study, we reinforce that this experimental model represents an excellent tool to explore biological aspects of congenital transmission by ZIKV and to identify antiviral molecules, including drug repositioning, especially for the treatment of infected pregnant women.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Febre do Zika</b>	<b>2</b>
1.1.1. Vírus Zika (ZIKV)	2
1.1.2. Epidemiologia	6
1.1.3. Manifestações Clínicas e Patogênese	9
1.1.3.1. <i>Transmissão Congênita do ZIKV</i>	10
<b>1.2. Placenta Humana</b>	<b>11</b>
1.2.1. Formação da Placenta Humana	11
1.2.2. Estrutura e Função da Placenta Humana	14
1.2.2.1. <i>Vilosidade coriônica</i>	15
1.2.2.2. <i>Membrana fetal</i>	18
<b>1.3. Compostos com Potencial Atividade anti-Zikv</b>	<b>20</b>
1.3.1. Reposicionamento de drogas	20
1.3.1.1 Antiviral sobre o ZIKV	21
1.3.1.2 Annita® - <i>Nitazoxanida</i>	23
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b>	<b>25</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Manutenção das linhagens celulares, propagação e titulação viral</b>	<b>26</b>
3.1.1. <i>Linhagem de Célula C6/36 do Mosquito Aedes albopictus</i>	26
3.1.2. <i>Linhagem de Célula Vero de Mamífero Primata não humano</i>	26
3.1.3. <i>Massa Viral</i>	26
3.1.4. <i>Ensaio de unidades formadoras de placas (Plaque)</i>	27
<b>3.2. Vírus Zika (ZIKV)</b>	<b>27</b>
3.2.1. Sequenciamento Nucleotídico	28
<b>3.3. Explantes e Células Primárias de Placenta Humana a Termo</b>	<b>29</b>
3.3.1. <i>Placenta e explantes</i>	29

3.3.2. Células primárias da membrana fetal	29
3.3.3. Células primárias da vilosidade coriônica	30
<b>3.4. Infecção e métodos de análise dos explantes e células primárias</b>	<b>30</b>
3.4.1. Infecção das Culturas Primárias e Explantes	30
3.4.2. Análise morfológica por Histologia	30
3.4.3. Detecção antigênica e análise fenotípica por Imunofluorescência	31
3.4.4. Análise ultraestrutural e detecção de partícula viral por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	31
3.4.5. Detecção da carga viral por Reação em Cadeia da Polimerase da Transcrição Reversa quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)	32
<b>3.5. Tratamento das culturas com Nitazoxanida (Annita®)</b>	<b>33</b>
3.5.1. Fármaco	33
3.5.2. Toxicidade celular do fármaco por reagente Metil Tiazolil Tetrazólio (MTT)	33
3.5.2. Atividade antiviral da Nitazoxanida	34
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Efeito citopático em células C6/36 e Título da massa viral</b>	<b>35</b>
<b>4.2. Análise da identidade nucleotídica da região parcial da NS1 do ZIKV<sup>BR</sup></b>	<b>38</b>
<b>4.3. Explantes de Placenta</b>	<b>39</b>
4.3.1. Caracterização Morfológica por Microscopia óptica e Fenotípica por Imunofluorescência	39
4.3.2. Caracterização Fenotípica e Detecção Antigênica por Imunofluorescência	42
<b>4.4. Obtenção e Caracterização Morfológica e Fenotípica das Culturas Primárias de Placenta Humana</b>	<b>45</b>
4.4.1. Isolamento de Células da membrana fetal e da vilosidade coriônica	45
4.4.2. Células amnióticas	47
4.4.3. Células coriônicas	49
4.4.4. Células das vilosidades coriônicas	54
<b>4.5. Avaliação das infecções pelo ZIKV em Culturas de Células Primárias de Placenta Humana</b>	<b>58</b>

4.5.1. Detecção de Antígeno Viral por Imunofluorescência	58
4.5.2. Detecção da Partícula Viral por MET	69
<b>4.6. Avaliação do Efeito Antiviral do Nitaxozanida em Culturas Primárias de Células Coriônicas e Explantes da Membrana Fetal</b>	<b>80</b>
4.6.1. Redução de células infectadas por detecção de antígeno viral	80
4.6.2. Redução de efeito citopático por ensaio de plaque e redução de carga viral por detecção de cópias de RNA viral	83
4.6.3. Avaliação morfológica por H&E dos explantes	85
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>87</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>95</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>96</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>106</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1.1: Estrutura genômica do vírus Zika.	3
Figura 1.2: Caminho de replicativo do ZIKV.	5
Figura 1.3: Linha do tempo de ocorrência de surtos epidemiológicos global de infecção pelo vírus Zika.	7
Figura 1.4: Países e territórios com transmissão ativa do ZIKV.	8
Figura 1.5: Microcefalia.	10
Figura 1.6: Implantação do Blastocisto.	12
Figura 1.7: Instauração do sistema vascular materno-fetal na placenta humana.	13
Figura 1.8: Placenta a termo.	14
Figura 1.9: Estrutura anatômica e circulação uteroplacentária.	16
Figura 1. 10: Anatomia da membrana amniocoriônica humana.	19
Figura 1. 11: Comparação dos processos de descoberta de fármacos clássica e o reposicionamento de fármacos.	21
Figura 1.12. Estruturas químicas de nitazoxanida e tizoxanida.	23

### RESULTADOS

Figura 4.1: Propagação de cepas brasileiras do vírus Zika e Dengue.	36
Figura 4.2: Titulação do vírus ZIKV <sup>BR</sup> .	37
Figura 4.3: Sequenciamento nucleotídico da região parcial da NS1 do ZIKV.	38
Figura 4.4: Explantes da membrana fetal de placenta humana a termo.	40
Figura 4.5: Explantes das vilosidades coriônicas de placenta humana a termo.	41
Figura 4.6: Imunofenotipagem por CK-7 e Detecção do antígeno viral em explantes por imunofluorescência.	43
Figura 4.7: Imunofenotipagem por vimentina e Detecção do antígeno viral em explantes de vilosidade coriônica por imunofluorescência.	44
Figura 4.8: Obtenção de células da membrana fetal e vilosidade coriônica.	46
Figura 4.9: Cultura primária de células amnióticas obtidas da membrana fetal.	48
Figura 4.10: Cultura primária de células amnióticas obtidas da membrana fetal.	49
Figura 4.11: Cultura primária de células coriônicas obtidas da membrana fetal.	50
Figura 4.12: Cultura primária de células coriônicas obtidas da membrana fetal.	51
Figura 4.13: Cultura primária de células coriônicas obtidas da membrana fetal.	52
Figura 4.14: Cultura primária de células coriônicas obtidas da membrana fetal.	53
Figura 4.15: Cultura de explantes de vilosidade coriônica.	55
Figura 4.16: Caracterização fenotípica por CK-7 dos esferóides e células proliferativas da vilosidade coriônica.	56
Figura 4.17: Caracterização fenotípica por vimentina dos esferóides e células proliferativas da vilosidade coriônica.	57

Figura 4.18: Detecção do antígeno viral por imunofluorescência dos esferoides e células proliferativas da vilosidade coriônica.	59
Figura 4.19: Cinética de infecção de células primárias amnióticas frente à baixa carga viral.	61
Figura 4.20: Detecção do antígeno viral junto a caracterização fenotípica por CK-7 de células primárias amnióticas.	62
Figura 4.21: Cinética de infecção de células primárias coriônicas frente à baixa carga viral.	64
Figura 4.22: Detecção do antígeno viral junto a caracterização fenotípica por vimentina de células primárias coriônicas.	65
Figura 4.23: Cinética de infecção de células primárias coriônicas frente à alta carga viral.	67
Figura 4.24: Análise da susceptibilidade e do perfil de infecção pelo vírus Zika.	68
Figura 4.25: Ultraestrutura de células coriônicas vimentina + por Microscopia Eletrônica de Transmissão.	70
Figura 4.26: Ultraestrutura de células coriônicas CK-7+I por Microscopia Eletrônica de Transmissão.	71
Figura 4.27: Ultraestrutura de organelas citoplasmáticas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.	72
Figura 4.28: Ultraestrutura do complexo de golgi por Microscopia Eletrônica de Transmissão.	73
Figura 4.29: Ultraestrutura <i>stress fibers</i> por Microscopia Eletrônica de Transmissão.	74
Figura 4.30: Ultraestrutura vesículas membrabares por Microscopia Eletrônica de Transmissão.	75
Figura 4.31: Ultraestrutura de células coriônicas infectadas por ZIKV e analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.	77
Figura 4.32: Detalhamento da desorganização ultraestrutural de células coriônicas infectadas por ZIKV e analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.	78
Figura 4.33: Presença da partícula viral em células coriônicas infectadas por ZIKV e analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.	79
Figura 4.34: Efeito citotóxico do fármaco Nitazoxanida em células primárias coriônicas.	81
Figura 4.35: Efeito antiviral do fármaco nitazoxanida em células primárias coriônicas.	82
Figura 4.36: Avaliação do efeito antiviral do fármaco nitazoxanida em células primárias coriônicas por ensaio de Plaque e RT-qPCR.	84
Figura 4.37: Efeito antiviral do fármaco nitazoxanida em explantes da membrana fetal.	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**Ag** - Antígeno

**C** - Proteína do capsídeo

**C6/36** - Célula de mosquito *Ae. Albopictus* clone 6 passagem 36

**CMC** - carboximetilcelulose

**CMV** - Citomegalovírus

**DMEM** - meio de cultura *Eagle* modificado por Dulbecco

**DMSO** - Dimetil sulfóxido

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**E** - Proteína do envelope

**EC** - Efeito Citopático

**EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

**FC** - Fator de Correção

**Fig.** - Figura

**h** - hora

**HBSS** - Hanks' Balanced Salt Solution

**HCV** - Vírus da Hepatite C (do inglês: *Hepatitis C virus*)

**HEPES** - Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroietil Piperazina-1

**HIV** - Vírus da Imunodeficiência Adquirida (do inglês: *Human immuno deficiency virus*)

**HHV** - Vírus herpes humano (do inglês: *Human herpes virus*)

**EC<sub>50</sub>** - concentração efetiva em reduzir 50% de células infectadas

**IFN**- Interferon

**IFN-  $\alpha$** - Interferon-alfa

**IL**- Interleucina

**SI** - Índice de Seletividade (do inglês: *Selectivity Index*)

**kDa** - KiloDalton

**L-15** - meio de cultura Leibowitz

**LD<sub>50</sub>** - dose letal que induz perda de viabilidade em 50% das células tratadas.

**M** - Proteína de membrana

**MOI** - Multiplicidade de Infecção

**mRNA** - Ácido Ribonucleico mensageiro

**MTT** - Metil TiazolilTetrazólio

**NC**- Não codificante

**NS**- Proteína não estrutural

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**ORF**- Fase de leitura aberta (do inglês: *open reading frame*)

**PBS** - **Tampão** fosfato-salino (do inglês: *phosphate buffered saline*)

**PFU** - Unidades Formadoras de Placas (do inglês: *plaque forming units*)

**pH**- Potencial de Hidrogênio

**prM** - Proteína pré-membrana

**RE**- Retículo Endoplasmático

**RNA** - Ácido Ribonucleico

**rpm** - Rotação por minuto

**RPMI 1640** - meio de cultivo celular

**RT** - Transcriptase Reversa

**RT-PCR**- Transcriptase reversa seguida da reação pela cadeia da polimerase (do inglês: *Reverse transcription polymerase chain reaction*)

**SFB** - Soro Fetal Bovino

**sNS1** - Proteína Não Estrutural 1 solúvel

**ssRNA+** - Fita simples de Ácido Ribonucleico com polaridade positiva

**WHO** - Organização Mundial da Saúde

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

**VERO**- Célula de rim de macaco verde Africano

**ZIKV**- Vírus Zika

**NTZ** – Nitazoxanida

**CK-7** – Citoqueratina-7

**g** - grama



## 1. INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) foi descoberto em 1947 no continente Africano em Uganda, desde então tem provocado infecções humanas esporádicas na África e Ásia (Dick e cols., 1952; Hayes, 2009). Em 2015, ganhou relevância quando foi associado no Brasil a ocorrência de casos de microcefalia e outras alterações do sistema nervoso central de natimortos/neonatos nascidos de mães que foram acometidas pela infecção (Sarno e cols., 2016; Brasil e cols., 2016). Em novembro de 2015 foi detectado o RNA viral em amostras de líquido amniótico de duas mulheres grávidas do estado da Paraíba, cujos bebês foram diagnosticados com microcefalia (Calvet e cols., 2016). No mesmo mês o Ministério da Saúde no Brasil estabeleceu a relação entre o aumento da ocorrência da microcefalia e infecção pelo ZIKV, através da detecção do genoma viral em amostras de sangue e tecido de recém-nascidos no estado do Pará (MS, 2015; Martines e cols., 2016).

A fisiopatologia da transmissão congênita está pouco elucidada, mesmo considerando o envolvimento de fatores virais, e imunes e genéticos do hospedeiro, ainda não se conhece o mecanismo pelo qual o vírus alcança o embrião/feto de gestantes infectadas. É possível que a infecção fetal ocorra pela passagem do vírus por espaços criados por lesões e/ou inflamação que podem quebrar a barreira placentária (Baurakiades e cols., 2011; Kim e cols., 2015). Outra hipótese é que o vírus alcance o feto através da infecção de células que formam a barreira placentária (Tabata e cols., 2016; Noronha e cols., 2016). Desta forma, estudos como o nosso que abordem a interação do ZIKV com células de placenta humana são de extrema relevância.

Além disso, apesar da infecção pelo ZIKV representar atualmente um grave problema de saúde pública, ainda não existe tratamento profilático e/ou terapêutico específico para esta infecção. Neste sentido, o reposicionamento de fármacos pode representar uma maneira mais rápida de se obter um medicamento eficaz durante surtos epidêmicos do ZIKV, especialmente aqueles classificados nas categorias A e B pela FDA (*food and drug administration*), liberados para administração em gestantes, como o Nitazoxanida (Cao et al., 2017).

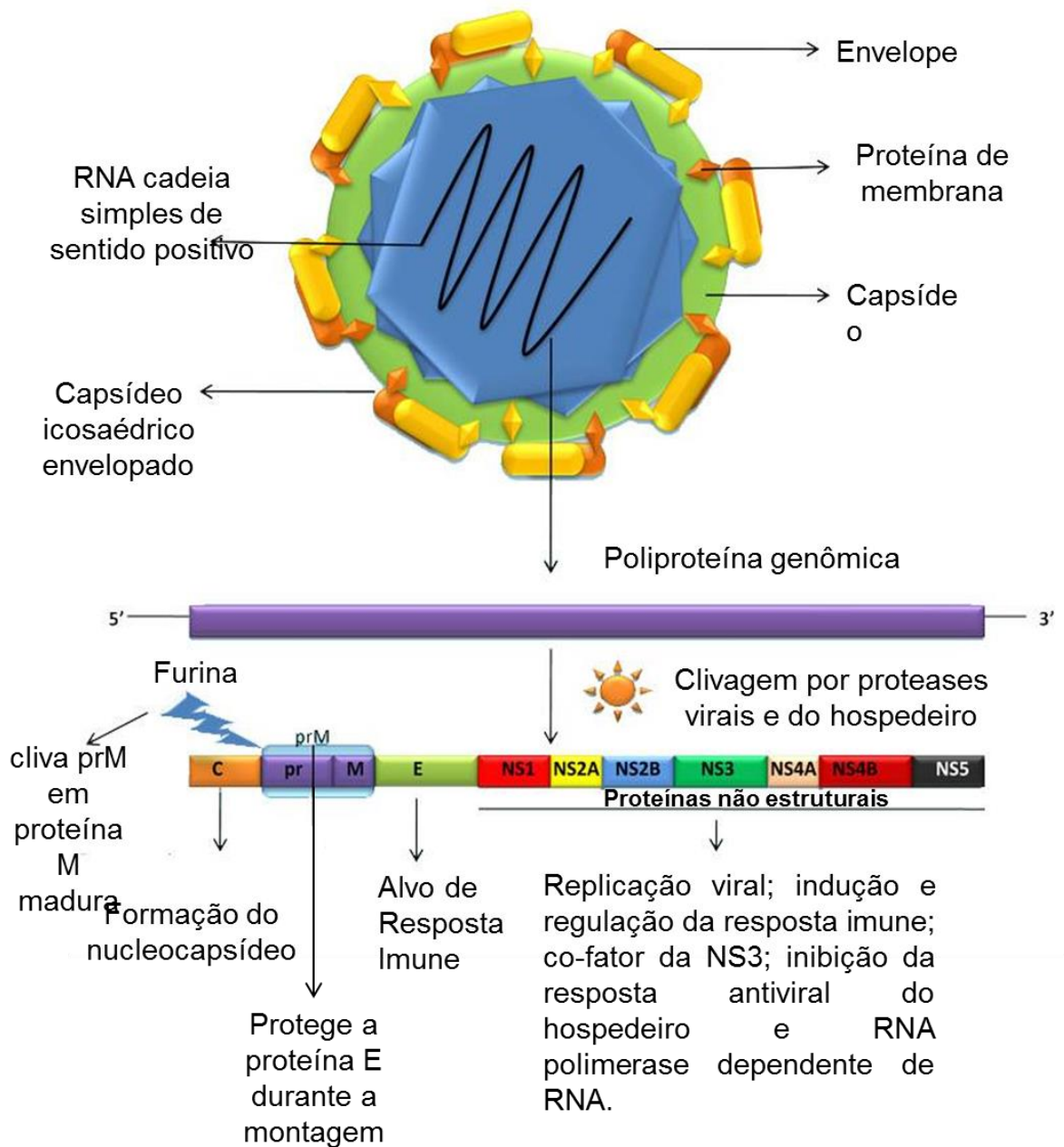
## 1.1. Febre do ZIKA

### 1.1.1 Vírus zika (ZIKV)

O vírus Zika pertence ao gênero Flavivírus da família Flaviviridae. A partícula viral dos Flavivírus é constituída por um envelope lipídico envolvido por proteínas estruturais de superfície denominadas: envelope (E), membrana (prM/M) e capsídeo (C) (Simmons e cols., 2012; Green e cols., 2013; Ginier e cols., 2016) (Figura 1.1). A proteína E é de suma importância para ligação do vírus a receptores glicoprotéicos da membrana celular do hospedeiro no processo de internalização. Além disso, possui vários determinantes antigênicos, que a torna um alvo efetivo da resposta imune protetora do hospedeiro (Rodenhuis-Zybert e cols., 2010).

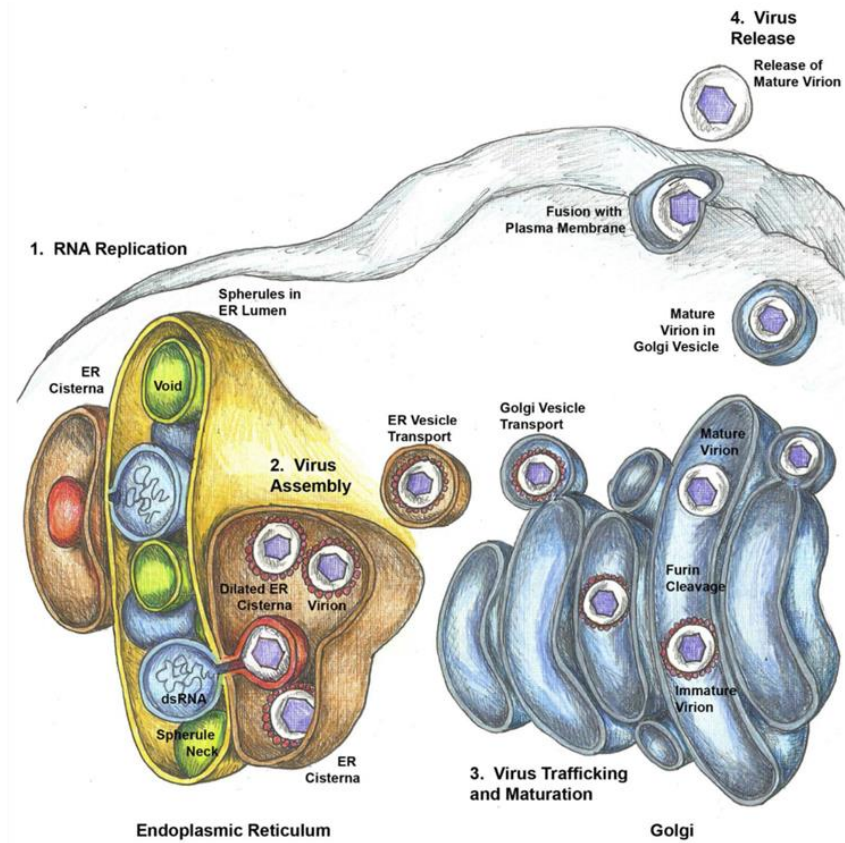
O genoma viral é composto por um ácido ribonucléico de fita simples, com polaridade positiva (ssRNA+) e aproximadamente 10.862 nucleotídeos (nt), flanqueada por duas regiões não traduzidas, 5' e 3' UTR (do inglês: *untranslated region*). Possui na sua extremidade 5' uma estrutura CAP para reconhecimento de ribossomos. Foi relatado que essas regiões não traduzidas estão relacionadas à replicação viral pela regulação da síntese de RNA e tradução da poliproteína (Kuhn e cols., 2002; Chen & Hamer, 2016). A porção N terminal do genoma codifica as proteínas estruturais E e prM, enquanto que o restante do genoma codifica as proteínas não estruturais (NS) NS1, NS2A-B, NS3, NS4A-B e NS5, que estão envolvidas no processo de replicação viral e regulação da resposta imune; Co-fator da NS3; inibição da resposta antiviral do hospedeiro e RNA polimerase dependente de RNA, respectivamente (Singhe cols., 2016; Charrel, 2016) (Figura 1.1).

A febre do Zika é uma arbovirose infecciosa, causada pelo ZIKV. É transmitida aos seres humanos principalmente através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, especialmente o *Ae. aegypti* em regiões tropicais, sendo este o mesmo agente transmissor do vírus dengue, Chikungunya e febre amarela (WHO, 2017). Atualmente tem sido descrito outras formas de transmissão como a sexual e vertical (Dortenzio e cols., 2016; Bin Cao, 2017).



**Figura 1.1: Estrutura genômica do vírus Zika.** O zika possui um RNA de cadeia simples de sentido positivo (ssRNA+) que será traduzido em uma única poliproteína com 3 genes que codificam proteínas estruturais (C, M, E) e 7 não estruturais, cujas funções estão em destaque. *Modificado de Singh e cols., 2016.*

O ciclo de replicação do ZIKV, até atualmente descrito, não difere dos demais membros do gênero Flavivirus. Foi demonstrado que a adsorção viral é mediada por receptores como TAM que compreendem uma família única de receptores tirosina quinases (AXL do inglês *receptor tyrosine kinase*) e (Tyro3 do inglês *protein tyrosine kinase*), DC-SIGN (do inglês *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), TIM-1 e TIM-4 (do inglês *T-cell immunoglobulin and mucin domain protein 1-4*) (Hamel e Cols., 2015). Os alvos primários da infecção são principalmente fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas, o que correlaciona com a transmissão vetorial através da picada do mosquito (Hamel e cols., 2015). Os vírus entram na célula hospedeira por endocitose mediada por Clatrina (Van der Schaare cols., 2007). Após a internalização, a partícula viral é envolvida pelo endossomo, e devido ao ambiente ácido deste compartimento ocorre a trimerização irreversível da proteína E acarretando na fusão da membrana viral com a membrana do endossomo tardio (Harrison, 2008). Dessa forma, o genoma viral é liberado no citoplasma, para replicação do RNA, tradução e clivagem da poliproteína e montagem no retículo endoplasmático, para posterior maturação no complexo de Golgi e liberação da partícula viral madura ou Vírión no meio extracelular (Lindenbach & Rice, 2007) (Figura 1.2).



**Figura 1.2: Caminho de replicação do ZIKV:** a replicação de RNA ocorre dentro de esférulas em cisternas no RE que protegem o dsRNA de iniciar uma resposta imune celular (Etapa 1). Os vírus são montados em cisternas de RE dilatadas próximas ao sítio de replicação de RNA viral (Etapa 2). Em vesículas de transporte, os vírus traficam para o Golgi, onde a proteína prM de ZIKV é clivada pela furina, resultando na maturação do virion (Etapa 3). Virions traficam de vesículas derivadas do Golgi para a membrana plasmática, saindo da célula por exocitose (Passo 4). Figura original de Rossignol e cols., 2017.

### 1.1.2 Epidemiologia

O ZIKV foi identificado pela primeira vez em 1947 na floresta ZIKA em Uganda, isolado de macacos *Rhesus* (macaca mullata) sentinela. Em 1948 foi isolado novamente de um “pool” de mosquitos *Aedes africanus* na mesma floresta (Dick e cols., 1952; Chan e cols., 2016) (Figura 1.3).

Os primeiros casos de infecção humana foram evidenciados na década de 50 através da detecção de anticorpos neutralizantes no soro de índios residentes da África (Kokernot e cols., 1965), Índia e sudeste da Ásia (Smithburn e cols., 1954; Lagoa, 1967). Em 2007, ocorreu o primeiro surto em humanos na Ásia (Duffy e cols., 2009). Posteriormente, ocorreram infecções subseqüentes pela Camboja, Filipinas e Tailândia (Cao-Lormeau e cols., 2014). No ano de 2013, na Polinésia Francesa ocorreram os primeiros casos graves da doença com complicações neurológicas, e interessante esse surto foi concomitante ao surto provocado pelos sorotipos 1 e 3 do dengue (Cao-Lormeau e cols., 2014, 2016). Na ilha de Páscoa, próximo ao Continente Americano, foi relatado 51 casos com a cepa da Polinésia Francesa no ano de 2014 (Roth e cols., 2014; Lesser e cols., 2016) (Figura 1.4). No final do ano de 2014, o ZIKV se espalhou amplamente, atingindo mais de 50 países pelas Américas (Desai e cols., 2017; Fauci & Morens, 2016) (Figura 1.4).

Em 2015, no Brasil, ocorreu um surto de infecção pelo ZIKV, juntamente com a ocorrência de bebês com microcefalia (Brasil e cols., 2015). A incidência de ambos os casos alertou as autoridades de saúde sobre uma associação potencial entre a infecção por ZIKV e microcefalia (Weaver e cols., 2016). Diante do alto número de casos, a OMS declarou Emergência de Saúde Pública Internacional (ESPII) para ZIKA e casos de microcefalia em 1º de fevereiro de 2016 (Lesser e cols., 2016). Os primeiros casos confirmados da infecção foram reportados em abril de 2015 e segundo dados do Ministério da Saúde, até dezembro de 2016 foram notificados 215.319 casos da doença no país (Brasil, 2017) e 2.975 casos de microcefalia associados ao ZIKV apenas no ano de 2015 (Ritter e cols., 2017; Brasil, 2016; Portal saúde, 2016; Singh e cols., 2016) Em novembro de 2016, embora 322 novos casos de microcefalia tenham sido registrados no país até maio de 2017, o Comitê de Emergência (CE) sobre zika e microcefalia convocado pela Diretora-Geral da OMS considerou que o vírus zika e suas consequências associadas continuam a ser um desafio de saúde pública que exige uma ação intensa, mas que já não representa uma

ESPII tal como definida no Regulamento Sanitário Internacional. Muitos aspectos desta doença e com sequências associadas ainda devem ser compreendidos (Figura 1.3).

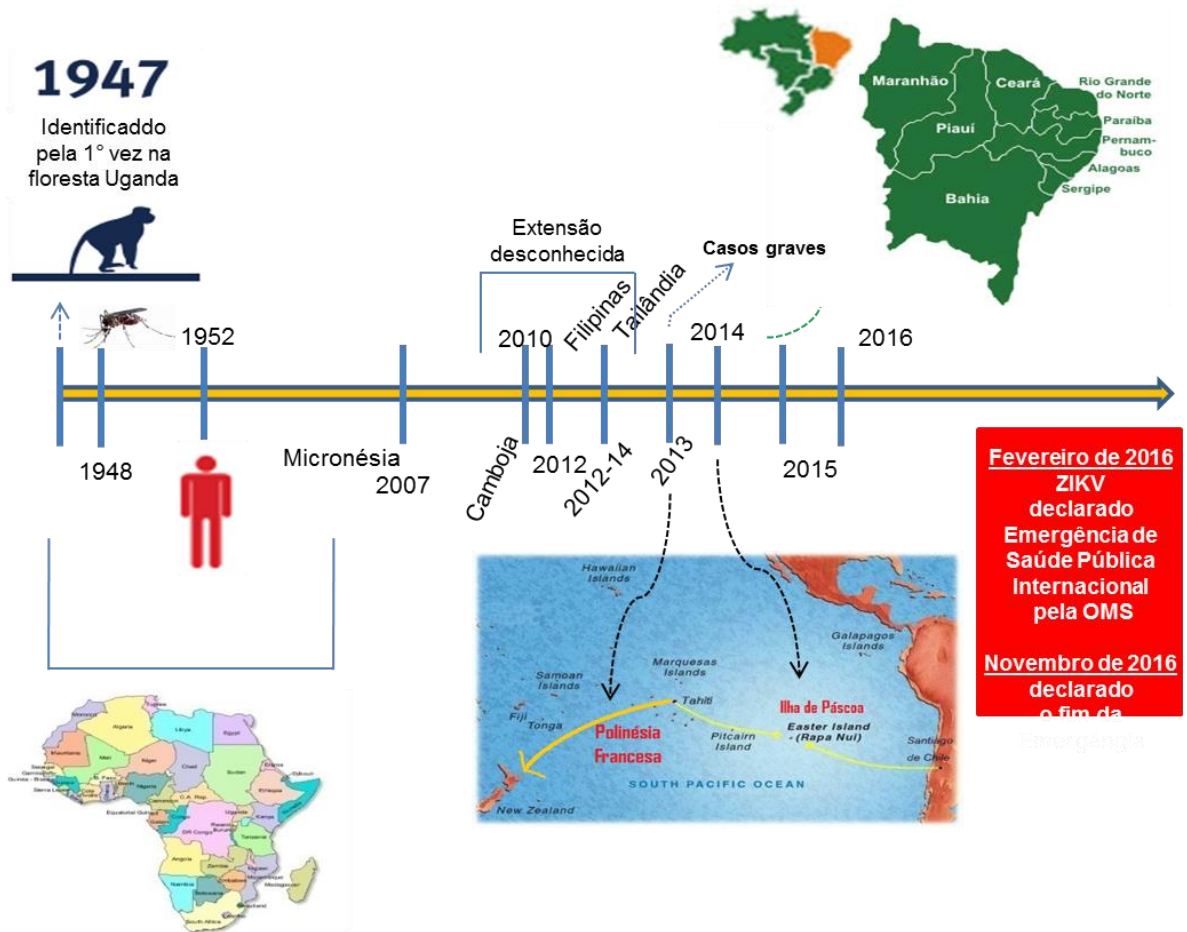


Figura 1.3: Linha do tempo de ocorrência de surtos epidemiológicos global de infecção pelo vírus Zika.



**Figura 1.4: Países e territórios com transmissão ativa do ZIKV:** Áreas laranja mostram países e territórios com transmissão ativa. *Desai e cols., 2017.*



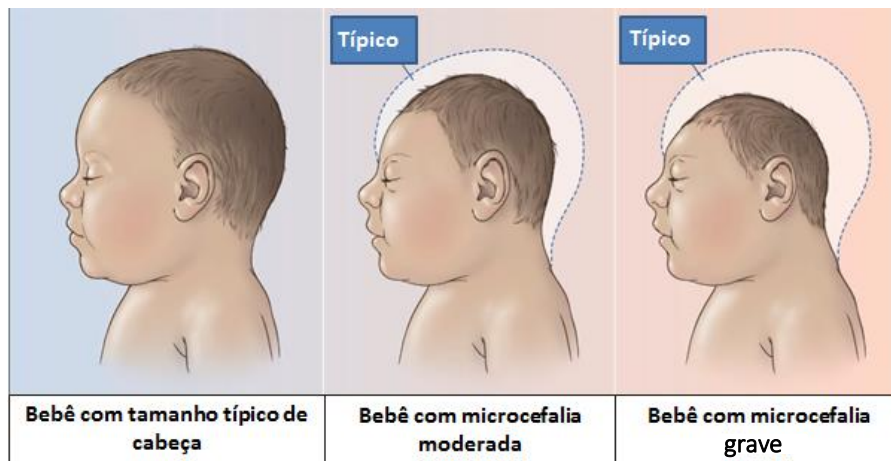
### 1.1.3 Manifestações clínicas e Patogênese

A patogênese do ZIKV ainda não está bem estabelecida, cerca de 80% dos indivíduos infectados não apresentam sintomas (Ritter e cols., 2017), no entanto, alguns indivíduos podem manifestar sinais clínicos indiferenciados e autolimitante, como: febre baixa, leves dores articulares, conjuntivite e exantema maculopapular que duram aproximadamente 7 dias. Porém, casos graves como síndrome de Guillan-barré, Mielite aguda e doenças autoimunes, já foram relatados (Cao-Lormeu e cols., 2016; Mecharles e cols., 2016). Na fase de viremia, que compreende os primeiros dias após o aparecimento dos sintomas, é recomendado o isolamento do doente para evitar picadas de mosquitos e infecção de outras pessoas (WHO, 2017).

Segundo as recomendações do Ministério da Saúde, o tratamento dos sintomas brandos com paracetamol deve ser indicado para dor e febre. Além disso, o uso de antialérgico é indicado para tratar as erupções cutâneas. Assim como na dengue, o tratamento com ácido acetilsalicílico e anti-inflamatórios não esteroidais é desaconselhado devido ao risco aumentado de hemorragias (Atif Me cols., 2016; CDC, 2016).

Até o ano de 2015, a febre do Zika só apresentava como forma grave da doença a Síndrome de Guillan-barré. No entanto, ocorreu no Brasil um surto de Zika afetando mulheres grávidas, cujos bebês nascidos vivos ou natimortos apresentavam microcefalia; malformação congênita classificada como redução da circunferência do crânio e cérebro do feto, acarretando em incapacidade cognitiva, sensorial e motora da criança (Rodrigues, 2016; Tang., 2016; Zanluca e cols., 2015) (Figura 1.5).

Desde então, vários estudos confirmaram a associação da infecção por ZIKV e microcefalia e o atual termo utilizado para os casos de transmissão vertical é a Síndrome da Zika Congênita (Costa e cols., 2016; Donald e cols., 2018). De fato, estudos tem cada vez mais demonstrado que ZIKV tem tropismos por células progenitoras neurais humanas. Além de infectar e produzir alta taxa de replicação, o ZIKV induzir apoptose e impede a diferenciação neuronal. Esses mecanismos induzidos pela infecção contribuem para a microcefalia (Li e Cols., 2016; Tang., 2016).



**Figura 1.5: Microcefalia:** crianças com Microcefalia Moderada ou Grave associada à infecção pelo Vírus Zika, em comparação com um recém-nascido normal. *Modificado de Petersen e cols., 2016.*

### 1.1.3.1 Transmissão Congênita do ZIKV

A infecção pelo ZIKV durante a gravidez está associada a graves defeitos congênitos, no entanto, as vias de transmissão entre a mãe e o feto ainda não estão totalmente esclarecidas (Tabata e cols., 2016). A transmissão transplacentária em humanos pode ser favorecida por apresentar uma placenta hemocorial, representada pelo estreito contato entre os tecidos fetal e materno (Parolini e cols., 2008; Kumpe & Manoussaka, 2012). Isto aumenta a possibilidade de uma mãe infectada propagar agentes patológicos para o feto, tanto por transferência hematogênica quanto por infecção de células uterinas e placentárias (El Costa e cols., 2016).

Desta forma, diferentes rotas de transmissão transplacentária do ZIKV ao feto têm sido descritas. Tabata e colaboradores (2016) em um estudo envolvendo células e explantes de placenta humana demonstraram duas possíveis rotas de transmissão: a paraplacentar, onde a infecção de células decíduais uterinas se propaga para a membrana coriônica, atravessa esta barreira e alcança o feto. E a placentar, nesse caso, o sangue materno contendo partículas infecciosas banha a placenta infectando as células locais para alcançar os vasos fetais.

Quick e colaboradores (2016) levantaram a hipótese de que macrófagos de placenta humana (Células Hofbauer) quando infectados poderiam desempenhar um papel chave na transmissão do vírus ao feto, uma vez que em seu estudo o ZIKV infectou e replicou nas células de Hofbauer de placenta humana. Sendo assim, esse tipo celular que possui potencial migratório pode transferir o vírus para células da placenta, bem como para os capilares fetais.

Vários estudos reforçam que a infecção placentária durante o período gestacional possui uma relação com os casos de microcefalia. Malkar e colaboradores (2016) demonstraram que foi detectada microcefalia com calcificação no cérebro fetal e placenta materna no último trimestre através de exame de ultrassonografia, essa mãe apresentou sintomas de ZIKA no primeiro trimestre da gestação. Martinês e colaboradores (2016) detectaram RNA e proteína viral em tecido cerebral fetal e placenta de mãe infectada. Juntos esses dados reforçam a necessidade de estudos com o modelo de infecção pelo ZIKV de células de placenta humana, para um melhor entendimento dos fatores celulares, neste órgão, que influenciam para o sucesso da infecção e possível descoberta de potenciais alvos de intervenção.

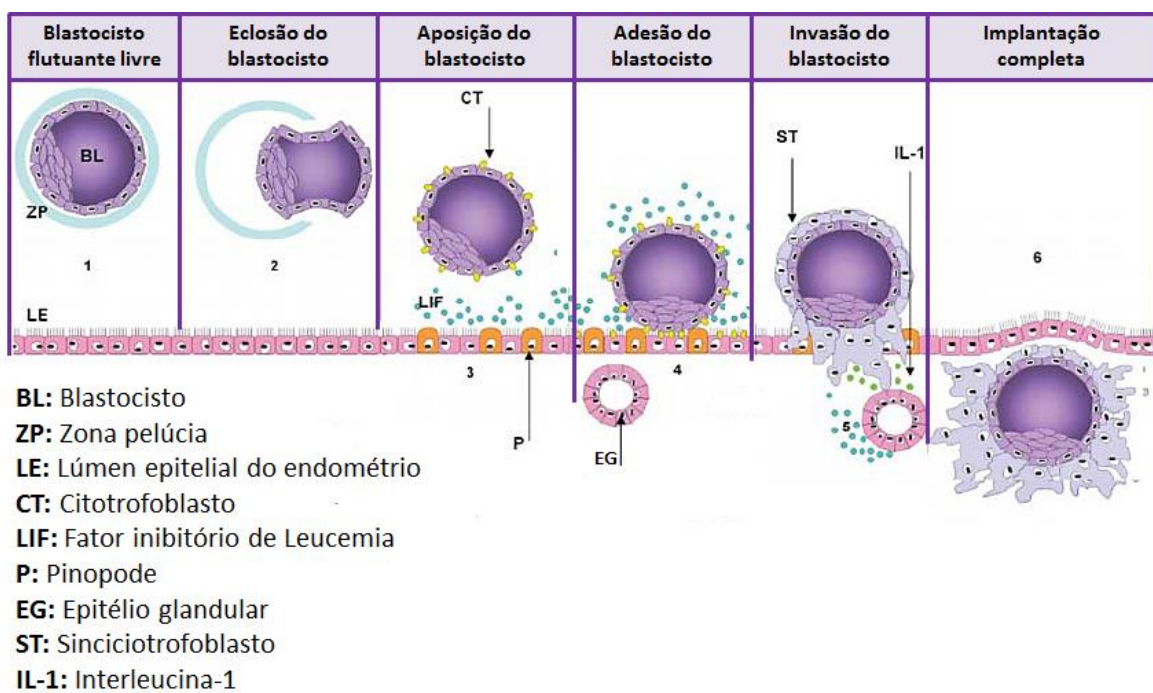
## **1.2. Placenta Humana**

### **1.2.1 Formação da Placenta Humana**

A placenta é um anexo embrionário temporário que estabelece a interface materno-fetal através de trocas fisiológicas, sem que haja o contato direto entre a circulação materna e fetal. Este órgão é formado no início do período gestacional, mais precisamente na segunda semana do desenvolvimento humano após o processo de implantação embrionária. O processo de nidagem, ou seja, fixação do embrião no endométrio (mucosa que reveste a parede do útero internamente) possui algumas etapas específicas. A primeira delas denominada *hatching* (eclosão), ocorre a saída do blastocisto por ruptura ou degeneração da zona pelúcida provocado por ação de proteases liberadas de células trofoblásticas. Além disso, outras etapas e processos críticos ocorrem, como: aposição do blastocisto no endométrio, adesão do trofoblasto ao epitélio endometrial seguida de invasão da lâmina basal e estromal (Padro, 2012; Fitzgerald e cols., 2008) (Figura 1.6).

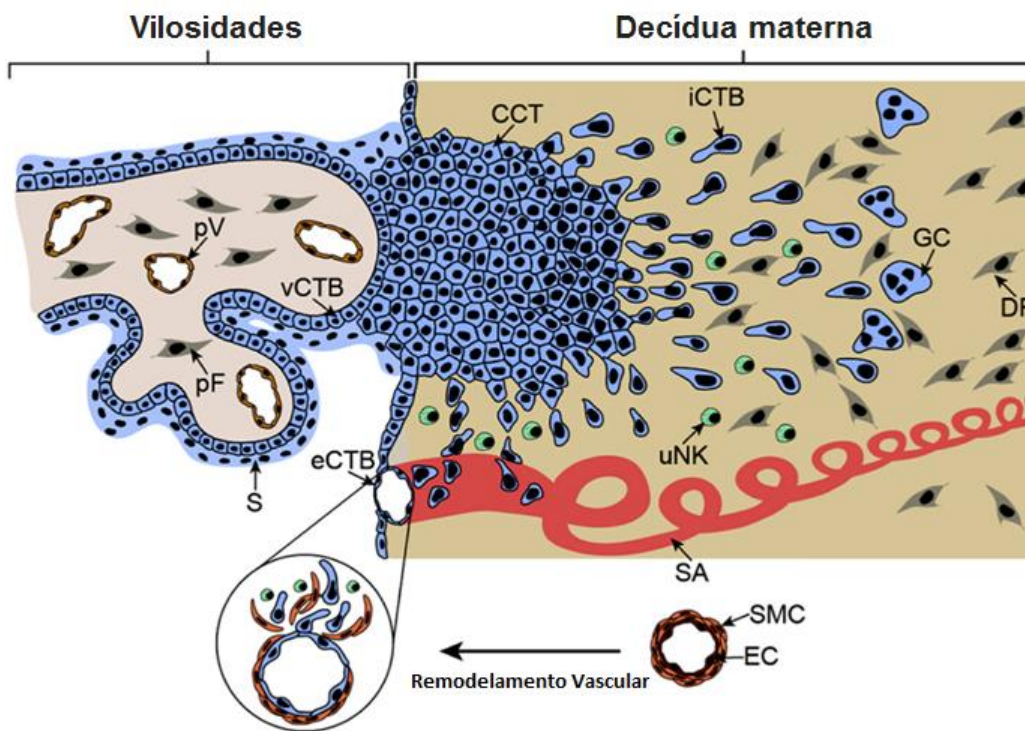
O preparo fisiológico do endométrio para o processo de implantação é regulado pela liberação dos hormônios estradiol e progesterona, além de outros biomarcadores,

pois estes influenciam ativamente na adesão de moléculas na superfície endometrial que facilitam a implantação do blastocisto (Blackburn, 2003) (Figura 1.6). Após o ancoramento do blastocisto no epitélio uterino, ocorre a fusão e diferenciação das células trofoblásticas, originando uma camada externa de células multinucleadas não mitóticas denominadas sinciciotrofoblastos e internamente um grupo de células permanecem individualizadas e mononucleadas, altamente proliferativas, os citotrofoblastos (CTBs) (Frost & Moore, 2010) (Figura 1.6).



**Figura 1.6: Implantação do Blastocisto:** 1-Blastocisto livre no útero cercado por zona pelúcida. 2-Blastocisto eclodindo da zona pelúcida. 3-Aposição gradual de blastocisto ao endométrio, delineado por dois biomarcadores importantes para aceitividade endometrial, Pinopodes e LIF. 4-O blastocisto adere ao endométrio e produz o próprio LIF e eleva o número de Pinopodes na superfície endometrial, ocorre diferenciação de citotrofoblasto em sinciciotrofoblasto. 5-sinciciotrofoblasto invade o epitélio luminal, secreta citocinas como IL-1, que por sua vez estimula a expressão de LIF no endométrio. 6- A implantação está completa, a partir deste momento se inicia o processo de diferenciação para formação do embrião e os anexos embrionários. *Adaptado de Fitzgerald e cols, 2008.*

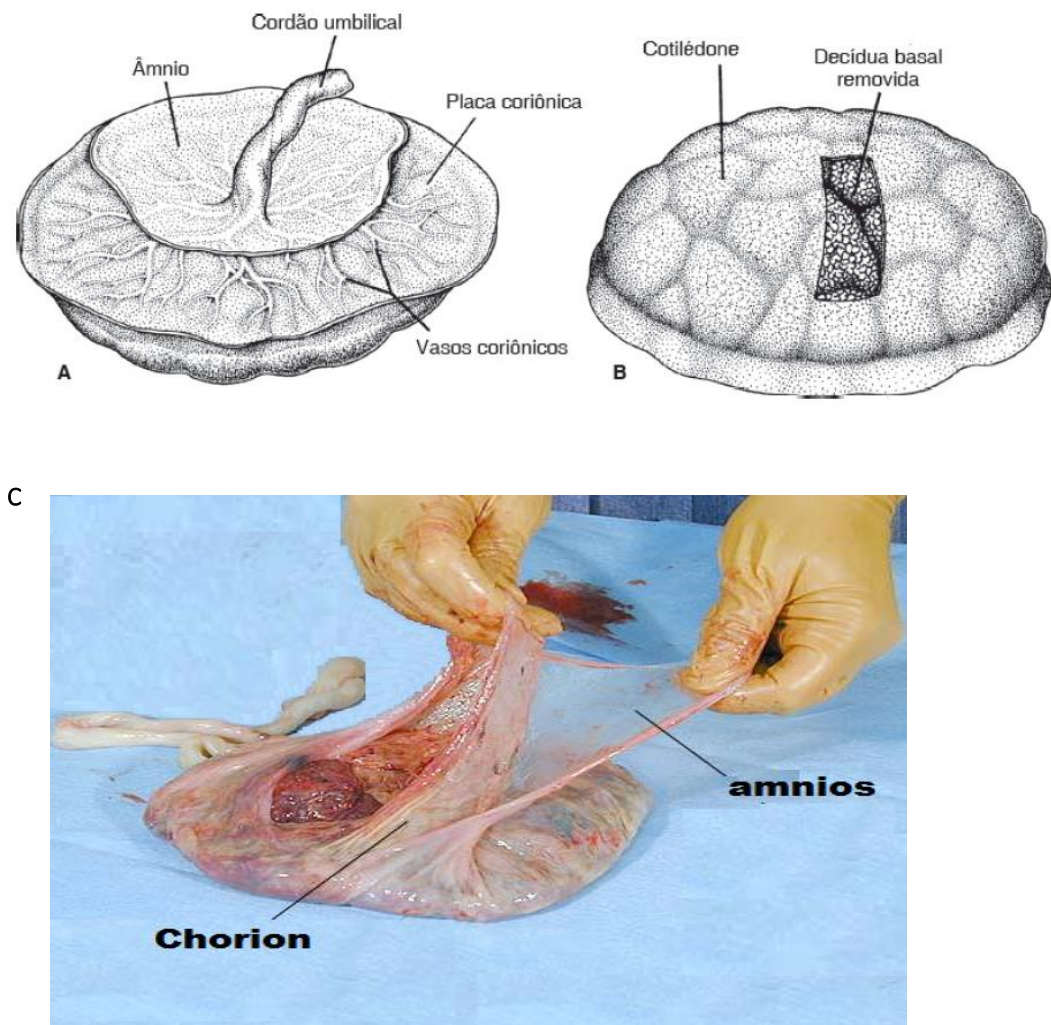
A partir da multiplicação desses tipos celulares, as vilosidades coriônicas da placenta são formadas (Blackburn, 2003; Sadler, 2016). Os citotrofblastos (CTBs) proliferativos diferenciam em trofoblasto extraviloso (TEVs) e migram para útero na decídua basal fazendo o processo de remodelamento das artérias uterinas (Figura 1.8), assegurando o fluxo sanguíneo para o espaço interviloso (EL Costa e cols., 2016; Smith, 2000). O passo seguinte é o processo de placentação, ou seja, a instauração vascular final, e em torno do quarto mês de gestação sua estrutura hemocorial esta totalmente estabelecida (Marostica, 2011) (Figura 1.7).



**Figura 1.7: Instauração do sistema vascular materno-fetal na placenta humana.** PV-vaso placentário; pF-fibroblastos placentários; vCTB-citotrofblasto viloso; S-sincício; eCTB-citotrofblasto endovascular; CCT-trofoblasto de coluna celular; iCTB-citotrofblasto intersticial; UNK-célula NK uterina; GC-célula gigante; DF-fibroblastos decíduais; SA-artéria espiral; SMC-célula de músculo liso e EC- célula endotelial. *Modificado de Knöfler & Pollheimer., 2013.*

### 1.2.2 Estrutura e Função da Placenta Humana

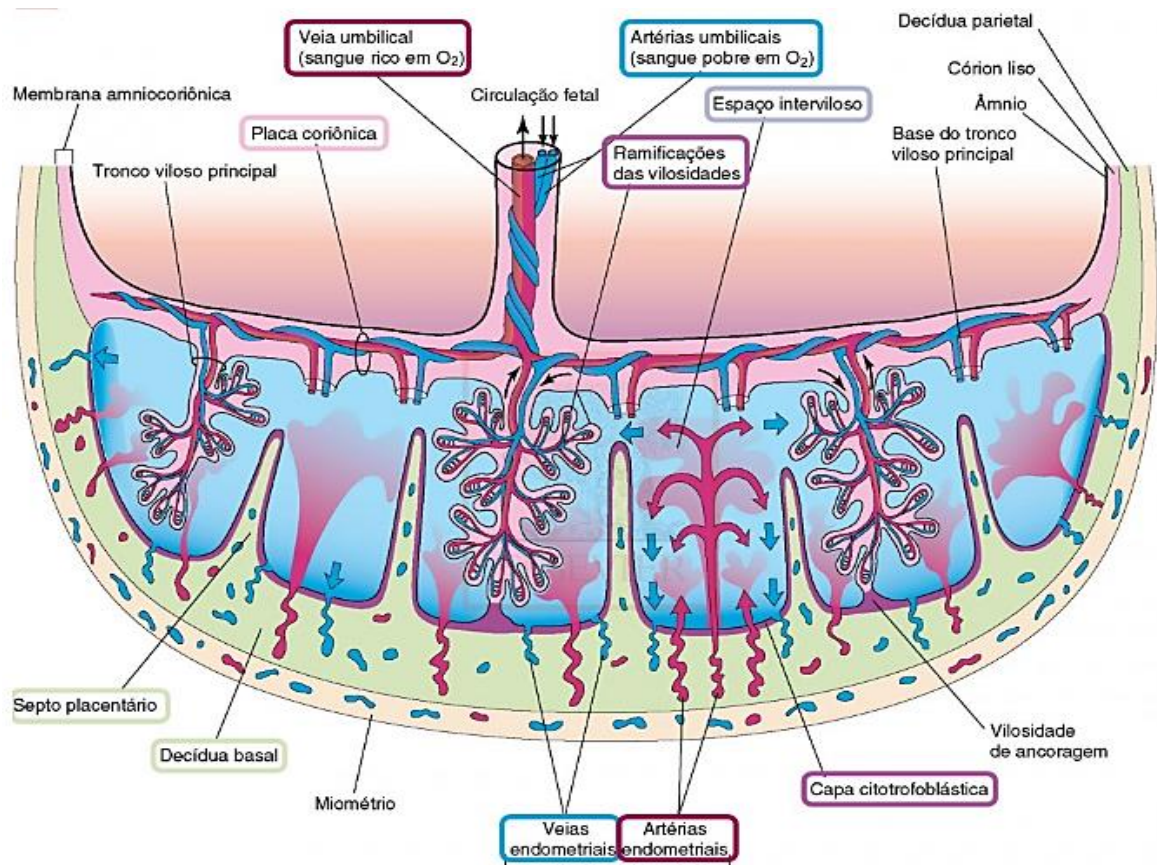
A placenta a termo é discóide e possui entre 15 e 20 cm de diâmetro, aproximadamente 3 cm espessura e pesa entre 500g e 600g. No momento ou após o parto, ela se desprende e é expelida da cavidade uterina. A superfície materna da placenta a termo é facilmente reconhecida, uma vez que possui os cotilédones, que são regiões salientes separadas por septos da decídua e recobertas por uma fina camada decidual (Figura 1.8B). Já a superfície fetal é encoberta na placa coriônica pela membrana fetal (âmnio e córion). É possível observar também artérias, veias e vasos coriônicos que se dirigem ao cordão umbilical (Sadler, 2016) (Figura 1.8A).



**Figura 1.8: Placenta a termo.** A- face fetal presença de cordão umbilical e âmnio cobrindo a placa coriônica, B- Face materna com presença de cotilédones e C- Membrana fetal separada mecanicamente em corion e amnion.

### 1.2.2.1 *Vilosidades Coriônicas*

A placenta é um órgão altamente vascularizado de suma importância para o desenvolvimento embrionário. Com relação a sua anatomia, a placenta a termo é composta pela placa coriônica e placa basal que circundam o espaço interviloso, como cobertura e parte inferior, respectivamente. Entre essas duas regiões, estão as principais estruturas relacionadas a funcionalidade da placenta, as vilosidades coriônicas. Esses arcabouços ramificados são amplamente distribuídos em todo espaço interviloso, onde estão presentes os vasos fetais. No espaço interviloso as vilosidades coriônicas são banhadas pelo sangue materno, onde ocorrem as trocas materno-fetais (Benitschke & Kaufmann, 2000; Gudee cols., 2004) (Figura 1.9). O sangue materno entra neste espaço vindo das artérias espirais localizadas no endométrio uterino e retorna pelas veias endometriais da decídua basal. O sangue oxigenado rico em nutrientes é capturado pela veia e/ou vênula nas vilosidades e transportado para o feto através da única veia umbilical, enquanto o sangue fetal pouco oxigenado e rico em excretas é liberado por duas artérias umbilicais nas artérias e arteríolas presentes nas vilosidades coriônicas, de onde passa para o espaço interviloso e são captados pelas veias endometriais (Blackburn, 2003) (Figura 1.9).



**Figura 1.9: Estrutura anátomo e circulação uteroplacentária.** Note como ocorre a circulação placentária fetal e materna, o transporte de sangue pelas artérias e veias umbilicais. *Moore e cols., 2012.*

No tocante a funcionalidade da placenta humana, como descrito anteriormente, este órgão é de suma importância para o sucesso gestacional, tendo em vista a variedade de trocas, produção e atividades de diversas moléculas de sinalização transplacentária necessárias para o desenvolvimento embrionário e fetal. Podendo considerar como principais as funções de: transporte; metabolismo; proteção e endócrina (Brollo e cols., 2010).

A placenta atua na transferência de gases respiratórios materno-fetal, graças a alta permeabilidade das membranas placentárias, especificamente das vilosidades. Dessa forma, a difusão do oxigênio ocorre de forma rápida e eficaz do sangue materno para



o fetal, bem como o dióxido de carbono do sangue fetal para o maternal. Além disso, a eficiência desta troca gasosa também está relacionada ao fato da hemoglobina fetal ter maior afinidade ao oxigênio e menor afinidade ao dióxido de carbono em relação a hemoglobina materna (Gude, 2004).

A importância do transporte e metabolismo de carboidratos através da placenta está diretamente relacionada a necessidade fetal ao consumo de energia, sendo a glicose o principal hidrato de carbono transportado pela placenta por difusão facilitada, auxiliada por proteínas como, as transportadoras de glicose (GLUTs) presentes nas membranas das vilosidades coriônicas. Este processo de absorção e conversão da glicose em outros substratos é regulado pelos sincitiotrofoblastos (Illsley, 2000; Osmond e cols., 2001; Bauman e cols., 2002).

Diversas vitaminas, íons inorgânicos, água e minerais também são transferidos ao feto através da placenta, no entanto, por mecanismos distintos. A água depende da pressão hidrostática e osmótica para sua transferência (Stulc, 1997). Já as vitaminas são transferidas do sangue materno para o fetal por associação muitas vezes a proteínas, como por exemplo, o ferro que se associa a transferrina, o que também vale para alguns minerais (Cariappa e cols., 2003). O transporte de íons é um pouco mais complexo, porém na placenta sistemas de transporte ativo como Na/K ATPase, Ca ATPase, entre outros são responsáveis por esse tipo de transferência (Sibley e Cols., 2002).

A placenta também possui funções endócrinas importantes, pois produz hormônios, citocinas e fatores de crescimento que são essenciais para a regulação da interface materno-fetal, bem como, expressão de enzimas envolvidas no metabolismo hormonal. Dentre os principais hormônios placentários, o mais explorado é a gonotrofina coriônica humana (hCG), produzido pelo sincitiotrofoblasto e fornecido na circulação materno-fetal, podendo ser detectado no soro materno de 6 a 8 dias após a implantação e alcançando o pico em 60 a 90 dias de gestação quando inicia o período de declínio, por isso institui a base dos testes de gravidez (Malassine & Cronier, 2002). A hCG é uma glicoproteína com a principal função de manter o corpo lúteo para garantir a produção de progesterona até a placenta ser formada, além da participação na estimulação da fusão de citotrofoblasto e diferenciação funcional do trofoblasto viloso, que também é modulado por estradiol e glicocorticóide (Malassine & Cronier, 2002). Ademais, ela regula a síntese de testosterona pelas células de

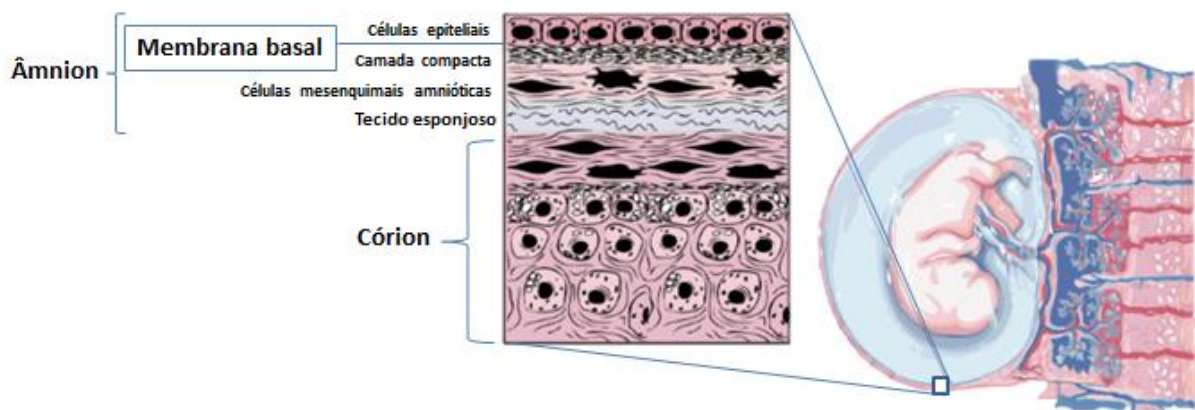
Leydig fetais, desempenhando um papel importante no desenvolvimento do feto (Molina, 2014).

Também há outros hormônios protéicos importantes, como o lactogênio placentário humano (hPL) que é sintetizado pelo sinciotrofoblasto e liberado na circulação materna e fetal. No feto o hPL participa da modulação do desenvolvimento através da estimulo a produção de IGF, insulina, além dos hormônios adrenocorticais e o surfactante pulmonar (Molina, 2014). Já o hormônio do crescimento humano (hGH) durante a gestação é expresso predominantemente na placenta e não é liberado para o feto, por isso, acredita-se que este não tenha relação direta sobre o crescimento fetal. Na mãe, participa na produção de outras substâncias, além de disponibilizar para o feto maiores concentrações de glicose e aminoácidos (Handwerger & Freemark, 2000). A placenta humana também tem por função a produção de hormônios esteroides como estrógeno e progesterona.

#### 1.2.2.2 *Membranas Fetais*

A membrana amniótica humana ou âmion é a superfície mais interna da membrana fetal, esta constitui a cavidade amniótica, que envolve o feto em desenvolvimento e é preenchida pelo líquido amniótico (Figura 1.10). Esta face membranar, possui de 0,02 a 0,5 mm de espessura e é formada por 5 camadas. A primeira, constituída por uma monocamada de células epiteliais linearizadas sob a lamina basal, além disso, possui uma região avascular denominada “estroma”. Essa região estromal é composta por uma camada compacta rica em colágeno, uma camada de células mesenquimais amnióticas finalizada por uma camada esponjosa. (Malhotra & Jain, 2014; Bourne, 1960; Ramuta & Kreft, 2018) (Figura 1.10).

A superfície da membrana em contato com o útero materno é denominada membrana coriônica ou córion e possui além de células coriônicas, uma camada de mesoderma com regiões mesodérmicas e trofoblásticas (Romero e Cols., 2006) (Figura 1.10).



**Figura 1.10: Anatomia da membrana amniocoriônica humana.** As superfícies da membrana são compostas pelo âmnion (fetal) e córion (materna). A região mais interna é constituída por células mesenquimais amnióticas e coriônica divididas por tecido esponjoso. *Modificado de Heckmann e cols., 2016.*

A membrana amniocoriônica se rompe durante o processo de trabalho de parto devido as contrações uterinas, se tratando de um parto a termo. Quando a mesma é rompida antes do período final da gestação, isso acarreta em um parto prematuro, este fato é considerado um fator de risco importante no que diz respeito à morbidade e mortalidade neonatal (Uchide e Cols., 2016). De fato, além da proteção física, esta membrana possui diversas outras funções desejáveis para um bom desenvolvimento fetal como, síntese de fatores de crescimento e citocinas; transporte de água e solutos; manutenção de pH; além de formar limites entre o espaço fetal e ambiente decidual materno, formando uma barreira defensiva contra microorganismos patogênicos e outros agentes teratogênicos (Grossman & Dennis, 1987).

Esta membrana também tem sido muito estudada nos últimos anos, por apresentar células mesenquimais amnióticas que possuem alta propriedade de pluripotência, com capacidade de se diferenciar nas diferentes linhagens celulares que constituem as três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma). Este fato tem atraído diversos grupos de pesquisa da área de transplantes de tecidos, por representar uma fonte promissora de terapia baseada em células tronco, escapando de questões éticas, já que este órgão transitório é descartado após o parto (Mamede e cols., 2012; Dua, 2004; Lee & Tseng, 1997; Hassan e cols., 2013).

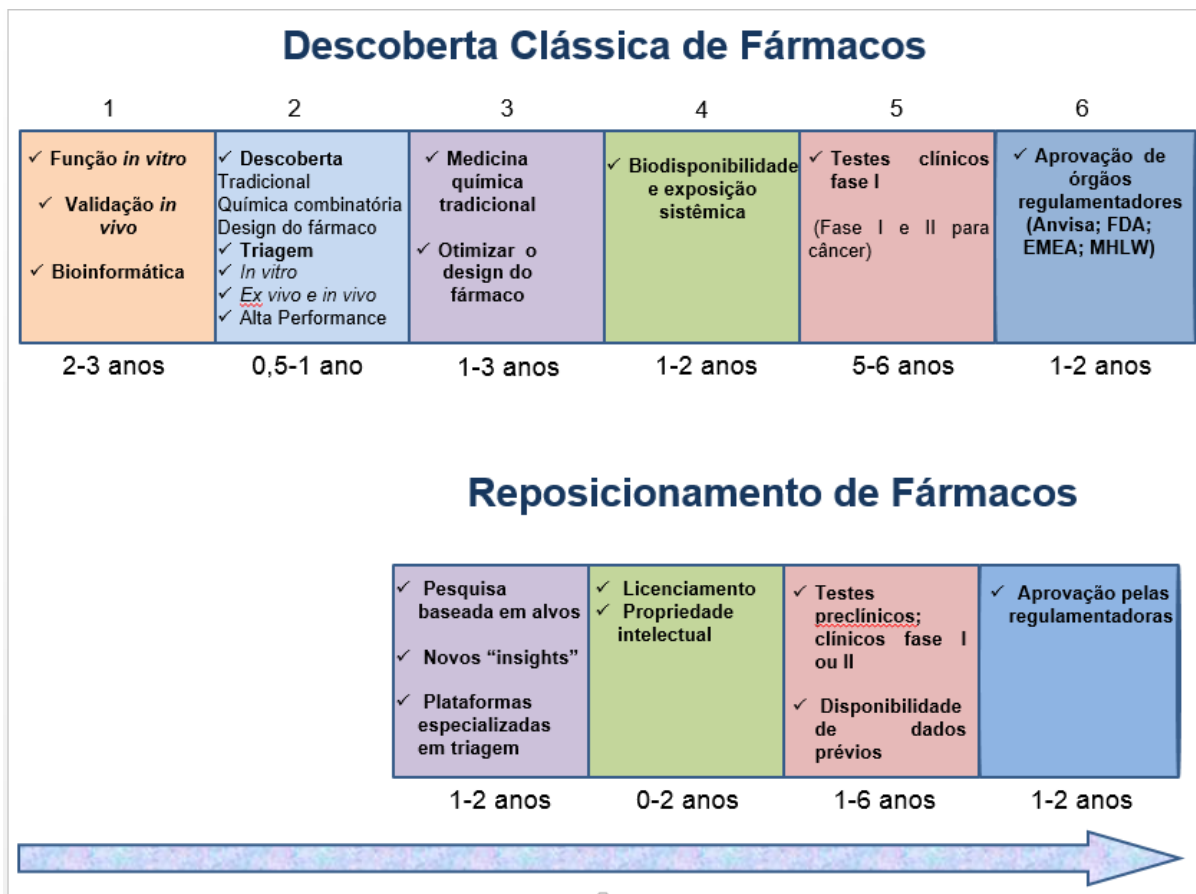
## 1.3 Compostos com Potencial Atividade anti-ZIKV

### 1.3.1 Reposicionamento de drogas

O reposicionamento de fármacos tem por meta identificar e desenvolver novos usos para medicamentos existentes. Tem sido uma estratégia muito importante para as indústrias farmacêuticas (Figura 1.11). As indústrias investem fortemente no desenvolvimento de fármacos desde o processo de descoberta de uma molécula potencial para determinada patologia. No entanto, na grande maioria das vezes ao final poucas realmente demonstram ser eficazes para o uso terapêutico desejado. Levando em conta que todo esse processo leva aproximadamente 15 anos, e o retorno financeiro tem sido insatisfatório, com o reposicionamento de fármacos é possível otimizar o tempo e agilizar o processo de descoberta de fármacos (Ashburn & Thor, 2004).

O reposicionamento de fármacos, nada mais é que, a utilização de um medicamento que foi desenvolvido para a terapia de uma determinada doença, ser também, utilizado para terapia de outra patologia. Muitas vantagens podem ser evidenciadas por essa estratégia, como, as informações farmacológicas e de produção já disponíveis, além de toda etapa de segurança e toxicidade já verificadas (Shim & Liu, 2014; Ashburn & Thor, 2004).

Grandes empresas e órgãos de saúde reconhecidos mundialmente, como National Institutes of Health (NIH) tem adotado um sistema de bibliotecas de fármacos/drogas já aprovadas por empresas reguladoras com a FDA (*food and drug administration*), com o objetivo de testar milhares de compostos concomitantemente em células de linhagem. Através de uma triagem automatizada de autotendimento, compostos que exibem alguma atividade contra o patógeno em questão ou alguma ação terapêutica, é selecionado e denominado composto *Hit*, tornando-se candidato terapêutico a determinada enfermidade (Tjioe, 2015).



**Figura 1.11: Comparação dos processos de descoberta de fármacos clássica e o reposicionamento de fármacos.** 1- Descoberta de alvos. 2- Descoberta e triagem. 3- Otimização. 4- Farmacocinética. 5- Desenvolvimento. 6- Registro/regulamentação. *Adaptado de Ashburn & Thor, 2004.*

#### 1.3.1.1 Antiviral Sobre o ZIKV

A epidemia de ZIKA aqui no Brasil foi desastrosa e nos coloca a frente de uma necessidade da busca por terapia específica, principalmente para gestantes acometidas por essa infecção, a fim de bloquear a transmissão congênita de ZIKV.

Embora várias vacinas estejam em desenvolvimento com diferentes tecnologias, nenhuma foi licenciada para prevenir essa doença, até o momento. As medidas de prevenção, portanto, são as mesmas utilizadas para todos os casos de arboviroses que não possuem vacinas disponíveis, a proteção individual contra picadas de mosquitos com o uso de repelentes e o controle vetorial (Musso & Gubler, 2016).

Foi demonstrado em modelos de infecção pelo ZIKV, o efeito antiviral da Cloroquina, droga utilizada na clínica para o tratamento da malária. Neste estudo o tratamento de células tronco neural humana, células endoteliais da microvasculatura cerebral humana, neurosféricas de camundongo e células de linhagem Vero com Cloroquina, reduziu significativamente a infecção nos diferentes tipos celulares, sem causar citotoxicidade (Delvecchio e cols., 2016).

Recentemente, o Sofosbuvir; Cloroquina; Mefloquina, aprovados pela FDA demonstraram inibir a replicação de ZIKV *in vitro* e *in vivo* (Bullard-Feibelman et al., 2016; Sacramento et al., 2016; Delvecchio et al., 2016; Barrows et al., 2016; Ferreira et al., 2017). A atividade anti-ZIKV do Arbidol (umifenovir), um medicamento antiviral já utilizado na clínica em vários países contra o vírus da gripe, também foi demonstrada. Neste estudo, o composto exerceu atividade tanto contra a cepa Africana quanto a Asiática em culturas de células de linhagem, células primárias epiteliais vaginais e cervicais humanas. O Arbidol protegeu as culturas de contra os efeitos citopáticos causados pela infecção viral e seu mecanismo de ação parece ter ocorrido na etapa de adsorção viral, pois sua ação foi mais eficaz quando o tratamento das células foi realizado antes da inoculação viral (Fink et al., 2018).

Li e colaboradores (2017) realizaram um estudo de triagem de compostos, no contexto de reposicionamento de drogas, onde o alvo de estudo foi o complexo NS2-NS3 de ZIKV. Este complexo de protease desempenha um papel chave no processamento da poliproteína viral. Neste estudo, a Nitazoxanida demonstrou ser um candidato promissor como inibidor da interação NS2-NS3 protease na concentração de 4 µM, agindo no processamento da poliproteína e inibindo a replicação viral.

Ainda no contexto do reposicionamento de drogas, um estudo com bromocriptina, mostrou efeitos inibitórios da replicação viral do ZIKV *in vitro* demonstrados por ensaios de redução de plaque e efeito citopático. Esse efeito foi demonstrado de 0 a 12h após infecção de culturas de células VERO, sugerindo que seu mecanismo de ação ocorre durante eventos após internalização. Diante desse achado, Chan e colaboradores (2017) utilizaram um modelo de “docking” para investigar os possíveis mecanismos de ação do composto, e a molécula bromocriptina interagiu com sítios ativos da protease viral NS2B-NS3 do ZIKV demonstrando que sua ação pode ser por ocupar o sítio ativo e assim inibir a atividade da protease viral. Para fins confirmatórios os pesquisadores realizaram um ensaio de inibição da protease por fluorescência e de fato a molécula testada inibiu atividade da protease viral (Chan et al., 2017).

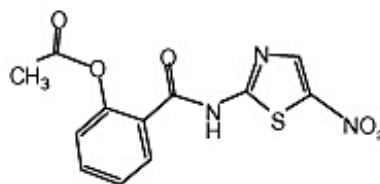
### 1.3.1.2 ANNITA® - Nitazoxanida

A Nitazoxanida, o fármaco utilizado no atual estudo, é comercializada no Brasil como ANNITA®, e rotineiramente utilizado na clínica, principalmente na pediatria para o tratamento de infecções helmínticas, parasitárias, além das gastroenterites virais (detalhamento na Bula, anexo 1) (Cabello e cols., 1997; Abaza e cols., 1998; Rossigno e cols., 2006).

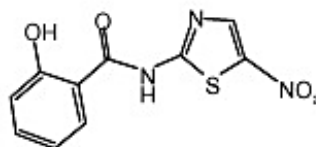
Este medicamento é aprovado pela FDA, órgão americano que regula a produção e venda de medicamentos nos EUA, e no Brasil é aprovado pela ANVISA. A Nitazoxanida esta na categoria B, que indica a administração em gestantes quando o benefício de seu uso supera os riscos teratogênicos.

Este fármaco (Figura 1.12) após administrado por via oral é hidrolisado imediatamente em seu metabolito ativo, denominado Tizoxanida (Belardo e cols., 2015). A fórmula molecular da Nitazoxanida é  $C_{12}H_9N_3O_5S$ .

Nitazoxanide



Tizoxanide



**Figura 1.12. Estruturas químicas de nitazoxanida e tizoxanida.** Medicamento Annita®, pó para suspensão oral 20mg/mL.

Embora pouco se saiba da diversidade dos possíveis mecanismos de ação da Nitazoxanida e seu metabolito, alguns estudos demonstraram que este medicamento age através da inibição de enzimas essenciais para a vida de protozoários, bem como de alguns helmintos, além de inibir proteínas primordiais para replicação e estrutura

viral (Rossignol, 2006; Rossignol & El-Gohary, 2006; Korba e cols., 2008; Adagu e cols., 2002).

Este agente possui amplo espectro antiviral contra diferentes vírus, como os da gripe A e B, incluindo os Influenza, vírus DNA e RNA de famílias distintas como o vírus dengue, febre amarela e o vírus respiratório sincicial (Rossignol e cols., 2014). Esses testes foram realizados *in vitro* e muitos deles já avançaram para os testes clínicos indicando um papel potencial para o tratamento de várias viroses (Sleeman e cols., 2014; Rossignol e Santoro, 2014; Haffizulla e cols., 2014).

A Tizoxanida também tem demonstrado uma boa atividade contra vírus da família *Flaviviridae* em ensaios *in vitro*, utilizando modelo de cultura de células. Por exemplo, quando essa molécula foi utilizada em experimentos realizados com cultura de células VERO frente a infecção com DENV-2 e YFV, foi observada uma redução significativa do percentual de infecção, nas células tratadas quando comparada a células não tratadas (Rossignol e Santoro, 2014).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Implementar o cultivo de explantes e células primárias de placenta humana a termo *ex vivo* para avaliação da infecção pelo ZIKV e terapia antiviral.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1. Sequenciar a cepa ZIKV<sup>BR</sup> do vírus ZIKV após propagação.
2. Caracterizar morfológica e fenotipicamente os explantes e células primárias de placenta.
3. Avaliar o perfil de infecção e susceptibilidade ao ZIKV nos explantes e células primárias de placenta.
4. Avaliar o efeito antiviral do fármaco Nitazoxanida em cultura de explantes e células coriônicas infectadas pelo ZIKV.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Manutenção das linhagens celulares, propagação e titulação viral

##### 3.1.1. *Linhagem de Célula C6/36 do Mosquito Aedes albopictus*

A propagação viral foi realizada por passagens em clone C6/36 obtidas do mosquito *Aedes albopictus*. As culturas foram mantidas em estufa a 28°C em garrafas de 25cm<sup>2</sup> de área de cultura com meio Leibowitz L-15 suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB), 10% triptose fosfato, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina, 2% L-glutamina, 1% aminoácidos não essenciais e 1,5% bicarbonato de sódio. O procedimento de dissociação das células foi realizado por tripsina 0,25%, em seguida as células foram lavadas, centrifugadas a 250g/ 10 min. para quantificação em câmara de Neubauer ao microscópio óptico. As células foram congeladas a uma concentração de 2x10<sup>6</sup>/ml em meio Leibowitz L-15 contendo 20% SFB e 10%DMSO em tubos de criopreservação e armazenados em nitrogênio líquido ou plaqueadas para os ensaios de produção de massa viral viral.

##### 3.1.2. *Linhagem de Célula Vero de Mamífero Primata não humano*

As células de linhagem Vero (fibroblasto de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*)) foram cultivadas em garrafas de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> de área de cultura contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina, 2% L-glutamina e 1% HEPES. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O procedimento de dissociação das células foi realizado por solução de 0,25% tripsina e 0,025% EDTA por 3 minutos a 37°C e, em seguida as células foram quantificadas em câmara de Neubauer ao microscópio óptico. As células foram congeladas a uma concentração de 2x10<sup>6</sup>/ml em meio RPMI 1640 contendo 20% SFB e 10% DMSO em tubos de criopreservação e armazenados em nitrogênio líquido ou plaqueadas para os ensaios de Plaque.

##### 3.1.3. *Massa Viral*

Células C6/36 com 80% de confluência foram infectadas com a Multiplicidade de infecção (MOI= razão do número de vírus por número de células) 0,01 da cepa ZIKV<sup>BR</sup> por 1h/a 28°C, sob agitação a cada 15 min. em meio de cultura Leibowitz L-15

suplementado com 2% SFB. Após o período de adsorção viral, o inóculo foi descartado e adicionado 5 ml de meio de cultura Leibowitz L-15 suplementado com 2% SFB. As culturas foram mantidas em estufa a 28°C por 7 dias para acompanhamento do efeito citopático. Posteriormente, o sobrenadante das culturas foi coletado, centrifugado a 250g /10 min. para retirada de restos celulares. Em seguida, foi congelado a -70°C para posterior titulação por ensaio de Plaque.

#### **3.1.4. Ensaio de unidades formadoras de placas (Plaque)**

O vírus propagado foi titulado em cultura de células Vero pelo ensaio de Plaque. Em resumo, as células foram semeadas em placas de 24 poços na densidade celular de  $15 \times 10^4$  células/poço e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e as células foram inoculadas com 100 µl das diferentes diluições seriadas da massa viral ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) em meio não suplementado de cultura RPMI 1640, em triplicata, seguido de incubação durante 1 h/37°C, sob agitação a cada 15 minutos. Em seguida, a cada poço foi adicionado 1 ml do meio semi-sólido RPMI 1640 contendo 3% carboximetilcelulose (CMC), 10% meio 199 10X, 5% SFB, 5% bicarbonato de sódio e 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, seguindo a incubação a 37°C por 7 dias. Após, as células foram fixadas com 3,6% formaldeído overnight e coradas com 0,04% cristal violeta durante 1h/temperatura ambiente. O número de placas de lise foi quantificado para cálculo de unidade formadora de Plaque da amostra, e o título viral determinado de acordo com a fórmula  $T = M \times ID \times FC$ , onde: (T) título expresso em PFU/mL = (M) média do n° de placas de lise contadas em uma determinada diluição x (ID) Inverso do fator de diluição, onde as placas de lise foram contadas x (FC) fator de correção do inóculo para mL (De Madrid & Porterfield, 1969). Os resultados foram expressos como unidades formadoras de placas (do inglês PFU/ml).

#### **3.2. Vírus Zika (ZIKV)**

Os estudos foram realizados com a cepa do ZIKV ZIKV<sup>BR</sup> (Acesso GenBank - KX212103), cedido pela equipe da Dra. Ana Bispo do laboratório de Flavivírus (IOC/FIOCRUZ).

### 3.2.1. Sequenciamento Nucleotídico

#### Extração do ácido nucléico, amplificação, sequenciamento nucleotídico e análise

A extração do ZIKV-RNA foi realizada utilizando-se o kit comercial “QIAamp Viral RNA Mini Kit” (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A síntese do cDNA e amplificação parcial da região que codifica para a proteína não estrutural NS1 do genoma do Zika vírus (RT-PCR) foi realizada, usando as enzimas SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase e a Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Inc), respectivamente por meio de uma reação de RT-PCR seguida de semi-nested. Foram utilizados os seguintes primers\*: Zk-PyroF\_Zk (5` TGGAAAACATHATGTGGARATCA 3`, 2618-2639) e os reversos Zk-PyroR1 (5` CGGCTGGRTCACAYTCTARTGAAT 3`, 2976-2953-) e o Zk PyroR2 (5` ACTAGTGTGRAADACYCCRAACC 3`, 2927-2905), respectivamente, conforme previamente descrito em Rodrigues, 2017. As reações foram submetidas as seguintes condições de termociclagens padronizadas para este estudo e executada no equipamento 9700 GeneAmp PCR Thermocycler (Applied Biosystem, Foster City, USA): a primeira fase foi a 50°C durante 30 min seguido pela inativação do domínio da transcriptase reversa a 95°C/2 min, com posterior início de 20 ciclos a 95°C por 1 min, 45°C por 1 min, e 68°C por 1 min. Essas condições foram repetidas por mais 20 ciclos, agora com uma temperatura de anelamento de 60 °C, seguido por um passo de alongamento final a 68°C por 5 min. O segundo “round” foi realizado com 20 ciclos 94 °C por 1 min, 57 °C por 45 s e 72 °C 1 min, com extensão final 72 °C por 10 min. A amplificação foi confirmada pela visualização da banda esperada correspondente ao um tamanho de um de 311 pb em gel de agarose a 1,5% em TAE 1 x. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit da Roche (High Pure PCR Product, <http://lifescience.roche.com/>) e a quantificação foi subestimada através de análise comparativas dos amplicons com marcador de massa molecular (low DNA Mass, Invitrogen/Life Technologies). O DNA foi submetido ao seqüenciamento nucleotídico pelo método de Sanger através da Plataforma de Seqüenciamento automatizado de DNA PDTIS/FIOCRUZ (ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). As seqüências nucleotídicas obtidas foram alinhadas, editadas e analisadas por meio dos programas Bioedit (Hall, 1999) e MEGA7 (Tamura et al., 2007) e as sequencias foram então

submetidas ao programa de busca local de identidade nucleotídica BLAST: Basic Local Alignment Search Tool - NCBI – NIH (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

\*

H= A, C, T

R=A, G

Y= C, T

D= A, G, T

### **3.3. Explantes e Células Primárias de Placenta Humana a Termo**

#### **3.3.1. Placenta e explantes**

Como critério de inclusão, foram utilizadas placentas livres de infecções e sem alterações genéticas e clínicas, placentas provenientes de gestantes atendidas no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/FIOCRUZ), mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, anexo 2) (CEP 2.729.444, anexo 3). Os explantes da vilosidade coriônica e membrana fetal amniocoriônica foram separados da placenta e clivados em explantes de aproximadamente 3 mm de espessura, que foram cultivados por 24h – 72h em meio DMEM-F12 com 10% SFB, 2% L-glutamina, 100 U/mL Penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Total de 50 placentas foram utilizadas para padronização dos protocolos e apenas 5 foram aproveitadas para a realização dos ensaios experimentais.

#### **3.3.2. Células primárias da membrana fetal**

Após a coleta, a membrana fetal amniocoriônica formada pelas membranas coriônica (voltada para o tecido materno) e amniótica (voltada para o tecido fetal) foram separadas mecanicamente, lavadas 3x em solução HBSS e após clivagem em vários fragmentos foram submetidas a dissociação enzimática (0,1% tripsina com 100 µg/mL de DNase I) por 20 ou 40 minutos, sob agitação a 37°C. A suspensão de células obtidas foi centrifugada a 250g/ 10 min./4°C e o pellet ressuspenso em meio DMEM-F12 com 10% de SFB para inativação da enzima. O material dissociado foi submetido a nova centrifugação e filtrado em membrana de 100 µm para avaliação da viabilidade

celular pelo teste de exclusão por azul de *Trypan* e quantificação em câmara de Neubauer, seguida do plaqueamento em garrafas de cultura.

### **3.3.3. Células primárias da vilosidade coriônica**

Após a coleta, fragmentos de aproximadamente 2 g da vilosidade coriônica foram clivados e submetidos a dissociação enzimática (tripsina 0,1%) por 10 min. sob agitação a 37°C. Os fragmentos foram cultivados e acompanhados até 20 dias de cultivo, de acordo com o protocolo de Kolokoltsova e colaboradores (2017).

## **3.4. Infecção e métodos de análise dos explantes e células primárias**

### **3.4.1. Infecção das Culturas Primárias e Explantes**

As culturas de células primárias foram infectadas com ZIKV nas multiplicidades de infecção (MOI) 1, 10 e 20 por 2h, e os explantes com  $1 \times 10^6$  PFU/mL por 6h, sob agitação a cada 15 min./ 37°C. Após os períodos de adsorção viral, as culturas e os explantes foram lavados e mantidos por 24-72 h a 37°C em estufa com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes foram coletados para o ensaio de plaque e RT-qPCR.

### **3.4.2. Análise morfológica por Histologia**

Os explantes da vilosidade coriônica e membrana fetal amniocoriônica (membrana amniótica e membrana coriônica) não infectados foram lavados em tampão salina fosfatado (10 mM fosfato de sódio, 0.015 M NaCl, pH 7.4) e fixados em solução Millonig-Rosman (10% de formaldeído em tampão fosfatado). Os explantes fixados foram desidratados e embebidos em parafina, seguido de cortes de 3 µm de espessura e coloração de rotina por hematoxilina e eosina (H&E) para análise estrutural.

### **3.4.3. Detecção antigênica e análise fenotípica por Imunofluorescência**

Culturas primárias foram fixadas em 4% paraformaldeído (PFA) e os explantes foram emblocados em meio de inclusão OCT para cortes de 3 µm por criomicrotomia. Após permeabilização com 0.1 % triton-X-100 diluído em PBS por 5-10 minutos, as amostras foram lavagem e incubadas com a solução de bloqueio contendo 3% albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) / 30 min. Em seguida, com anticorpo monoclonal anti-flavivírus 4G2 para revelação da proteína do envelope viral (proteína E), produzido e fornecido por Biomanguinhos (Latam/Vdtec), diluído em PBS (1:500) incubado por 60 min/ temperatura ambiente.

Os anticorpos anti-citoqueratina-7 (1:200) e anti-vimentina (1:200) foram utilizados para fenotipagem por imunomarcação dos filamentos intermediários por 60 min/ temperatura ambiente, seguida da incubação com o anticorpo secundário IgG anti-mouse AlexaFluor 488 (1:500) (Invitrogen) por 60 min/ temperatura ambiente. Após marcação, as amostras foram incubadas com 10 µg/ml de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich) por 5 min/ temperatura ambiente, para visualização do núcleo celular. Finalmente, lâminas ou lamínulas foram montadas em 2,5% de 1,4-diazabicyclo (2,2,2) -octano (DABCO) (Sigma-Aldrich) para evitar a perda de fluorescência e imediatamente examinadas ao fotomicroscópio AxioObserver (Zeiss INC, Thornwood, NY). Os resultados foram expressos como percentual de células infectadas.

### **3.4.4. Análise ultraestrutural e detecção de partícula viral por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Células coriônicas primárias foram fixadas em 2,5% Glutaraldeído (Merck Darmstadt, Alemanha) em 0,1 M tampão cacodilato contendo 3,5% de sacarose, pH 7,2 para microscopia eletrônica de transmissão. Após a fixação as amostras foram lavadas duas vezes no 0,1 M tampão cacodilato e pós-fixadas por 30 min. à temperatura ambiente em 1% tetróxido de ósmio em 0,1M tampão cacodilato acrescido de 0,8% ferricianeto de potássio e 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>. Após esta etapa, o material foi lavado em tampão e desidratado em concentrações crescentes de acetona. O material foi impregnado com uma mistura de acetona: resina epoxy (v:v) por 18 h a 4 °C e a seguir

em resina pura por 4 h à temperatura ambiente, com troca para nova resina pura para polimerização por 3 dias a 60 °C. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo (Leica Ultracuts, UCT, Viena, Áustria), contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados ao microscópico eletrônico de transmissão Zeiss modelo EM10C.

### **3.4.5. Detecção da carga viral por Reação em Cadeia da Polimerase da Transcrição Reversa quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)**

#### Extração do RNA Viral

O RNA viral das amostras de sobrenadante foi extraído através do Kit de diagnóstico comercial *High Pure Viral Nucleic Acid kit* (Roche, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A cada tubo contendo 180 µl do sobrenadante das culturas foram adicionados 195 µl do tampão *Binding Buffer* enriquecido com 5 µl de *RNA Carrier* (ácido poliadenílico - Poly A) e 50 µl de proteinase K, incubados em termobloco a 72°C por 10 minutos. Em seguida, 100 µl de tampão *Binding Buffer* foram adicionados a cada amostra que foi transferida para coluna de sílica e submetida a uma centrifugação de 8000 g/ 1 min. Os tubos coletores das colunas foram descartados e novos tubos foram recolocados. Após a adição de 500 µl do tampão *Inhibitor Removal Buffer* as amostras foram submetidas à centrifugação de 8000 g/ 1 min e novamente feito o descarte e reposição dos coletores. Em seguida foram realizadas duas lavagens com 450 µl de tampão *Wash buffer* por centrifugação a 8000 g/ 1 min. Após as lavagens, nova centrifugação foi realizada à velocidade máxima de 16000 g/ 10 segundos a fim de eliminar os resíduos do tampão de lavagem. Cada coluna foi colocada em tubos cônicos estéreis de poliestireno de 1,5 ml e foram adicionados 60 µl do tampão *Elution buffer* para eluir o RNA. Após centrifugação a 8000 g/ 1 min. os tubos contendo RNA viral foram estocados a -70° C até o momento de sua utilização.

#### Quantificação da carga viral

Para quantificação do ZIKV foi realizado um One Step RT-PCR utilizando, primers, sondas e curva sintética para quantificação absoluta segundo o protocolo de Corman e colaboradores (2016).



### **3.5. Tratamento das culturas com Nitazoxanida (Annita®)**

#### **3.5.1. Fármaco**

O Nitazoxanida foi comprado formulado como medicamento Annita® (bula anexo 1) na concentração de 20mg/mL em pó. A solução estoque foi preparada na concentração de 10mg/mL diluída em 100% DMSO. A solução de trabalho foi preparada antes do uso, diluída 1:2 em meio de cultura, nas concentrações de (0-1600 µg/mL).

#### **3.5.2. Toxicidade celular do fármaco por reagente Metil Tiazolil Tetrazólio (MTT)**

Para excluir possíveis concentrações tóxicas às células hospedeiras, as culturas primárias foram cultivadas em placas de 96 poços ( $5 \times 10^4$  células/poço) e mantidas a 37°C em estufa de 5% CO<sub>2</sub> por 24 h. Em seguida, essas culturas foram tratadas com diferentes concentrações (0- 1600 µg/ml) dos compostos em triplicata por 48h/37°C. A morfologia das células foi avaliada por microscopia de luz a cada 24 h. O ensaio colorimétrico por MTT foi realizado nos tempos de 24 e 48 h. Resumidamente, 10 µL do reagente MTT, na concentração de 5 mg/mL, foi adicionado a cada poço contendo 90 µL de meio de cultura, e mantidos a 37 °C durante 4 h. Este ensaio mede a atividade metabólica celular que converte o reagente MTT em cristais de formazan solubilizados pela adição de DMSO. A densidade óptica foi medida a 590 nm em espectrofotômetro (VERSAmax, Molecular Device, EUA) para determinação do percentual de viabilidade celular das células tratadas (CT) em relação as células não tratadas (CNT) e cálculo do LC50 (concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade das células). Os controles foram realizados com meio de cultura na ausência de células ou incubados na presença de células sem ou com 0.1% de DMSO, concentração que conhecidamente não causa toxicidade a célula hospedeira. Os valores foram calculados com o mínimo de dois ensaios realizados em triplicatas.

### **3.5.2. Atividade antiviral da Nitazoxanida**

Foram realizados estoques a 10 mg/mL do fármaco comercial Annita® solubilizados em 100% DMSO. As soluções de trabalho foram preparadas imediatamente antes de seu uso, diluídas em meio de cultivo celular.

Para os ensaios de atividade antiviral, células coriônicas foram cultivadas em placas de 96 poços ( $5 \times 10^4$  células/ poço) e mantidas a 37°C em estufa de 5% CO<sub>2</sub> por 24 h. Após, foram infectadas com alta carga viral (MOI 20) por 2 h para adsorção sob agitação a cada 15 min. As culturas foram lavadas por 3 vezes para a retirada de partículas virais não adsorvidas. A cada poço foi adicionado meio de cultivo contendo diferente concentração da droga (0, 12.5, 25, 50 e 100 µg/ml) e incubadas por 48h/37°C. Ao final, as culturas foram fixadas com 4% PFA para imunofluorescência e os sobrenadantes foram coletados para o ensaio de Plaque e extração de RNA viral para o ensaio de RT-qPCR.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeito citopático em células C6/36 e Título da massa viral

Após confluência, a monocamada de células C6/36 (Fig. 4.1A) foi infectada pelo ZIKV (Fig. 4.1B) ou DENV-2 (Fig. 4.1C) e incubadas a 28°C por 7 dias para acompanhamento do efeito citopático (Fig. 4.1B e C). Na infecção pelo ZIKV é possível observar que o vírus não induz a formação de sincícios (fusão de várias células na presença da partícula viral), como ocorre frente a infecção pelo DENV-2 (Fig. 4.1C, seta). Ao contrário, a infecção pelo ZIKV induz morte e desacoplamento celular (Fig.4.1B, asterísco). Será abordada nesta dissertação apenas a infecção pelo ZIKV, no entanto, o efeito citopático induzido pelo DENV-2 está ilustrado para ressaltar os diferentes padrões de infecção produzidos entre dois Flavivirus no mesmo tipo celular (Fig. 4.1).

Desta forma, somente o sobrenadante da cultura infectada pelo ZIKV foi coletado para titulação viral em culturas de células Vero não infectadas ou infectadas pelo ZIKV com diluições seriadas da suspensão viral ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ). Após 7 dias, as unidades formadoras de placas foram reveladas pela coloração por cristal violeta (Fig. 4.2A-C). Na primeira passagem viral o título obtido foi de  $1,5 \times 10^7$  PFU/ml (Fig. 4.2A); na segunda passagem foi de  $3,2 \times 10^8$  PFU/ml (Fig. 4.2B) e na terceira  $3,3 \times 10^9$  PFU/ml (Fig. 4.2C). Foram feitas alíquotas com o volume de 300  $\mu$ l das amostras e estocadas a -70°C. Todos os ensaios a seguir foram realizados com o mesmo lote de propagação viral.

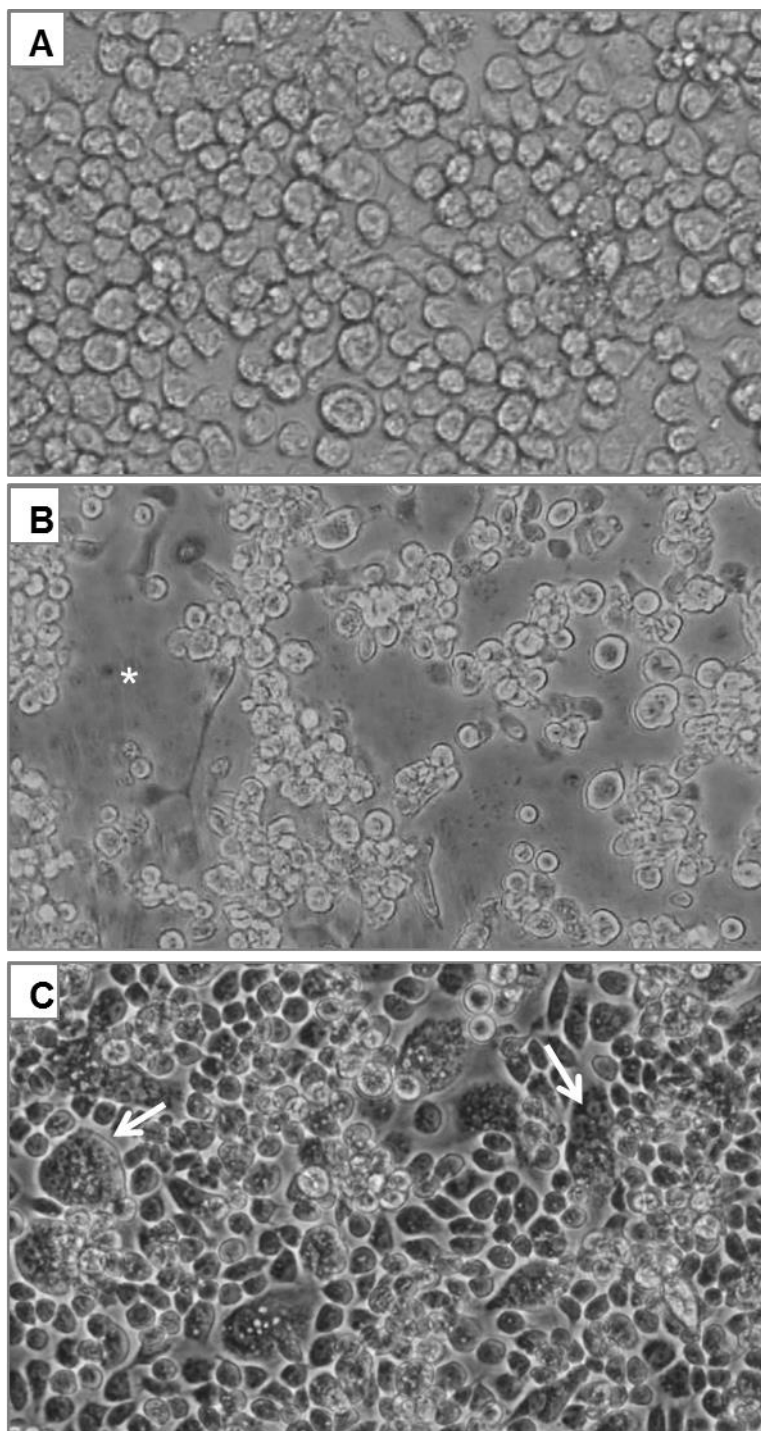


Figura 4.1: **Propagação da cepas Brasileiras do vírus Zika e Dengue:** células de linhagem C6/36 do mosquito *Aedes albopictus* foram cultivadas na presença de Mock (A) ou infectadas pelo ZIKV (B, asterisco indica efeito citopático por desacoplamento celular) e DENV-2 (C, seta indica sincício) com a multiplicidade de infecção (MOI) 0,01 por 7 dias até o aparecimento do Efeito Citopático. (ZIKV<sup>BR</sup>/GenBank, N° KX212103).

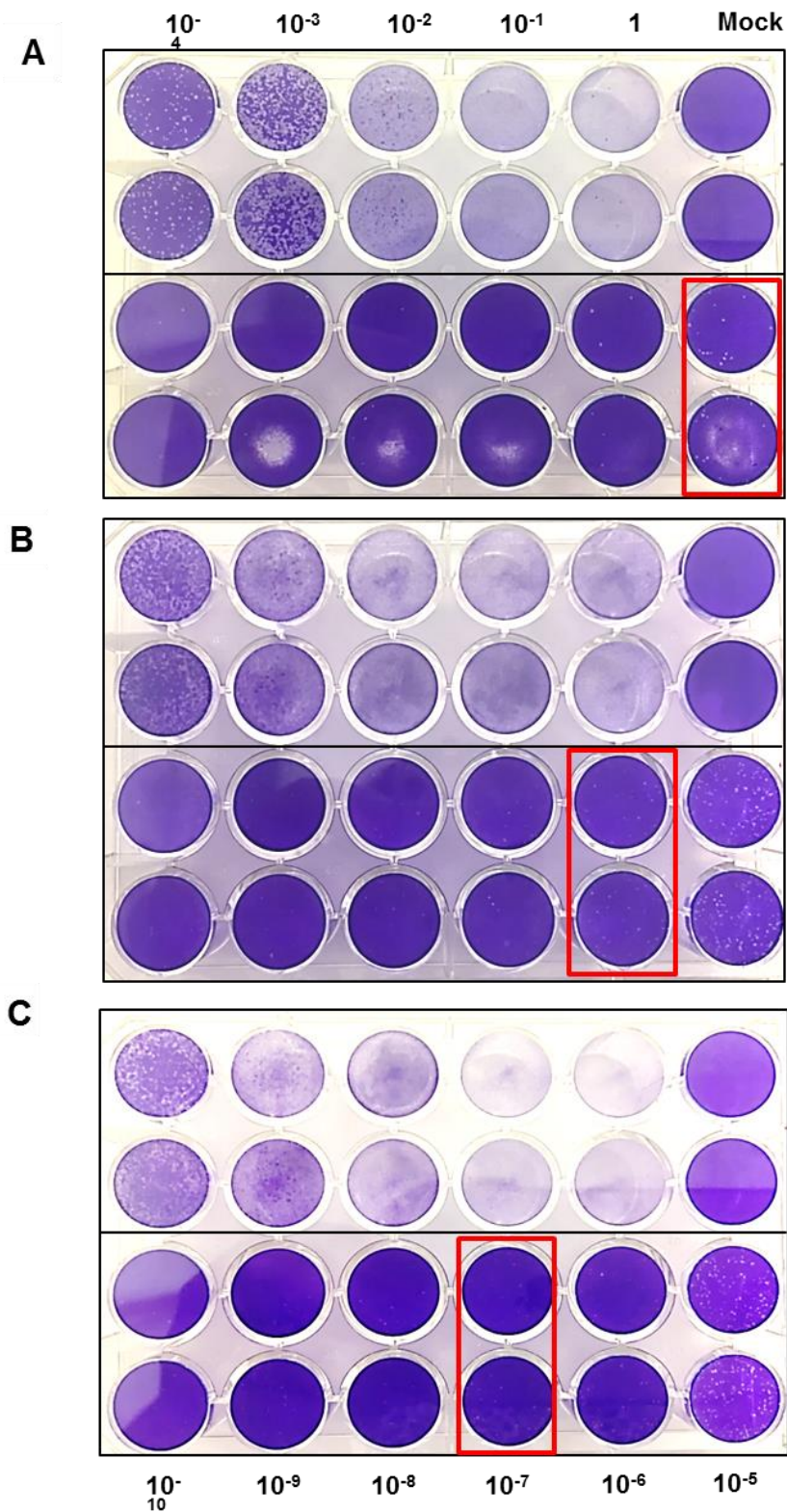


Figura 4.2: **Titulação do vírus ZIKV<sup>BR</sup>**: células de linhagem VERO foram semeadas em placa de 24 poços para incubação dos sobrenadantes de cultura de células Mock ou infectadas pelo ZIKV sem diluição (1) ou com diferentes diluições (1:10) para titulação da massa viral pelo ensaio de Plaque (A-C). (A) primeira passagem do ZIKV em células C6/36; (B) segunda passagem do ZIKV em células C6/36 e (C) terceira passagem do ZIKV em células C6/36.

## 4.2. Análise da identidade nucleotídica da região parcial da NS1 do ZIKV<sup>BR</sup>

Realizamos o sequenciamento de uma região parcial da proteína viral não estrutural NS1 do ZIKV (Fig. 4.3). Nestes ensaios foram feitos os sequenciamentos da região citada utilizando a cepa ZIKV<sup>BR</sup> propagada para a realização dos ensaios experimentais. A sequencia obtida foi analisada por BLAST e mostrou uma identidade nucleotídica de 100% e um score mais elevado (490 bits) com a cepa Brazil-ZKV2015 (GenBank, nºKU497555, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). Sendo assim, confirmamos que os estudos estão sendo realizados com uma cepa circulante no Brasil, além disso, não detectamos nenhuma variação nucleotídica que tivesse ocorrido na região investigada, durante os ensaios de propagação viral (Fig. 4.3).

```

Blast result:

100% de identidade nucleotídica com o isolado Brazil-ZKV2015

Zika virus isolate Brazil-ZKV2015 (complete genome)

Sequence ID: KU497555.1 Length: 10793 Number of Matches: 1
Related Information
Range 1: 2693 to 2957 GenBankGraphicsNext Match reviousMatch
Alignment statistics for match #1

Score          Expect          Identities      Gaps           Strand
490 bits\(265\)  1e-134  265/265   (100%)        0/265 (0%)    Plus/Plus

Query_1        GTAGAAGGGGAGCTTAAACGCAATCCTGGAAGAGAATGGAGTTCAACTGACGGTCGTTGTG 60
|||||
Sbjct_2693     GTAGAAGGGGAGCTTAAACGCAATCCTGGAAGAGAATGGAGTTCAACTGACGGTCGTTGTG 2752

Query_61       GGATCTGTAAAAAACCCCATGTGGAGAGGTCCACAGAGATTGCCCGTGCCTGTGAACGAG 120
|||||
Sbjct_2753     GGATCTGTAAAAAACCCCATGTGGAGAGGTCCACAGAGATTGCCCGTGCCTGTGAACGAG 2812

Query_121      CTGCCCCACGGCTGGAAGGCTTGGGGGAAATCGTACTTCGTCAGAGCAGCAAAGACAAAT 180
|||||
Sbjct_2813     CTGCCCCACGGCTGGAAGGCTTGGGGGAAATCGTACTTCGTCAGAGCAGCAAAGACAAAT 2872

Query_181      AACAGCTTTGTTCGTGGATGTTGACACACTGAAGGAATGCCCACTCAAACATAGAGCATGG 240
|||||
Sbjct_2873     AACAGCTTTGTTCGTGGATGTTGACACACTGAAGGAATGCCCACTCAAACATAGAGCATGG 2932

Query_241      AACAGCTTTCTTGTGGAGGATCATG 265
|||||
Sbjct_2933     AACAGCTTTCTTGTGGAGGATCATG 2957

```

Figura 4.3: Sequenciamento nucleotídico da região parcial da NS1 do ZIKV: Query = sequência questionada do genômica da região parcial da cepa ZIKV<sup>BR</sup> propagada no estudo e Sbjct = sequência genômica contida no Banco de dados internacional da região parcial da cepa Brasil-ZKV2015.

### 4.3. Explantes de Placenta

#### 4.3.1. Caracterização Morfológica por Microscopia óptica e Fenotípica por Imunofluorescência

Explantes da membrana fetal amniocoriônica (Fig. 4.4), foram observados por microscopia ótica (Fig. 4.4A, seta) e por cortes histológicos (Fig. 4.4B-D). A análise histológica revela preservação estrutural podendo ser observadas as faces voltadas para o tecido materno, formada por células coriônicas e mesoderme (Fig. 4.4B, seta 1) e para o feto, formadas por epitélio de células amnióticas e mesoderme (Fig. 4.4B, seta 3) localizadas entre um tecido esponjoso intermediário (Fig. 4.4B, seta 2). A separação mecânica da membrana fetal em membrana amniótica e em membrana coriônica manteve a organização morfológica dos tecidos (Fig. 4.4C e D). Na membrana amniótica é observada uma fina camada epitelial de células cubóides achatadas sobre uma camada basal (Fig. 4.4C, seta). Abaixo uma camada estromal sem vasos, a mesoderme, com a presença de fibroblastos e células mesenquimais amnióticas (Fig. 4.4C, asterísco). A face voltada para o tecido materno também se mostrou preservada (Fig. 4.4D), constituída por células coriônicas epiteliais (Fig. 4.4D, seta) e mesoderme, com fibroblastos e células mesenquimais coriônicas (Fig. 4.4D, asterísco). É importante ressaltar que a membrana fetal amniótica é avascular, no entanto, é aderida a membrana fetal coriônica, que apresenta inúmeros capilares maternos (Fig. 1.9C e Fig. 4.4B, seta 1).

O cultivo de explantes da vilosidade coriônica também foi observado por microscopia ótica (Fig. 4.5A, seta). A análise estrutural das vilosidades foi realizada em cortes corados por H&E (Fig. 4.5B e C) e por imunofluorescência (Fig. 4.5D). É possível observar tecido fibrinóide (Fig. 4.5B, quadrado 1), espaço interviloso (Fig. 4.5B e C, quadrado 2) e tecido fetal (Fig. 4.5B, quadrado 3) com capilares fetais (Fig. 4.5B, seta). Também foi analisado em destaque nas vilosidades coriônicas, o mesoderma fetal (Fig. 4.5C, quadrado 1) com células mesenquimais; fibroblastos e macrófagos fetais (Hofbauer) (seta branca), sinciciotrofoblasto (seta preta longa) e citotrofoblasto (cabeça de seta branca). As vilosidades coriônicas foram imunofenotipadas com o marcador citoqueratina -7 (CK-7) em vermelho, para evidenciar células epiteliais trofoblásticas (sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto) e por DAPI em azul para visualização do núcleo celular (Fig. 4.5D).

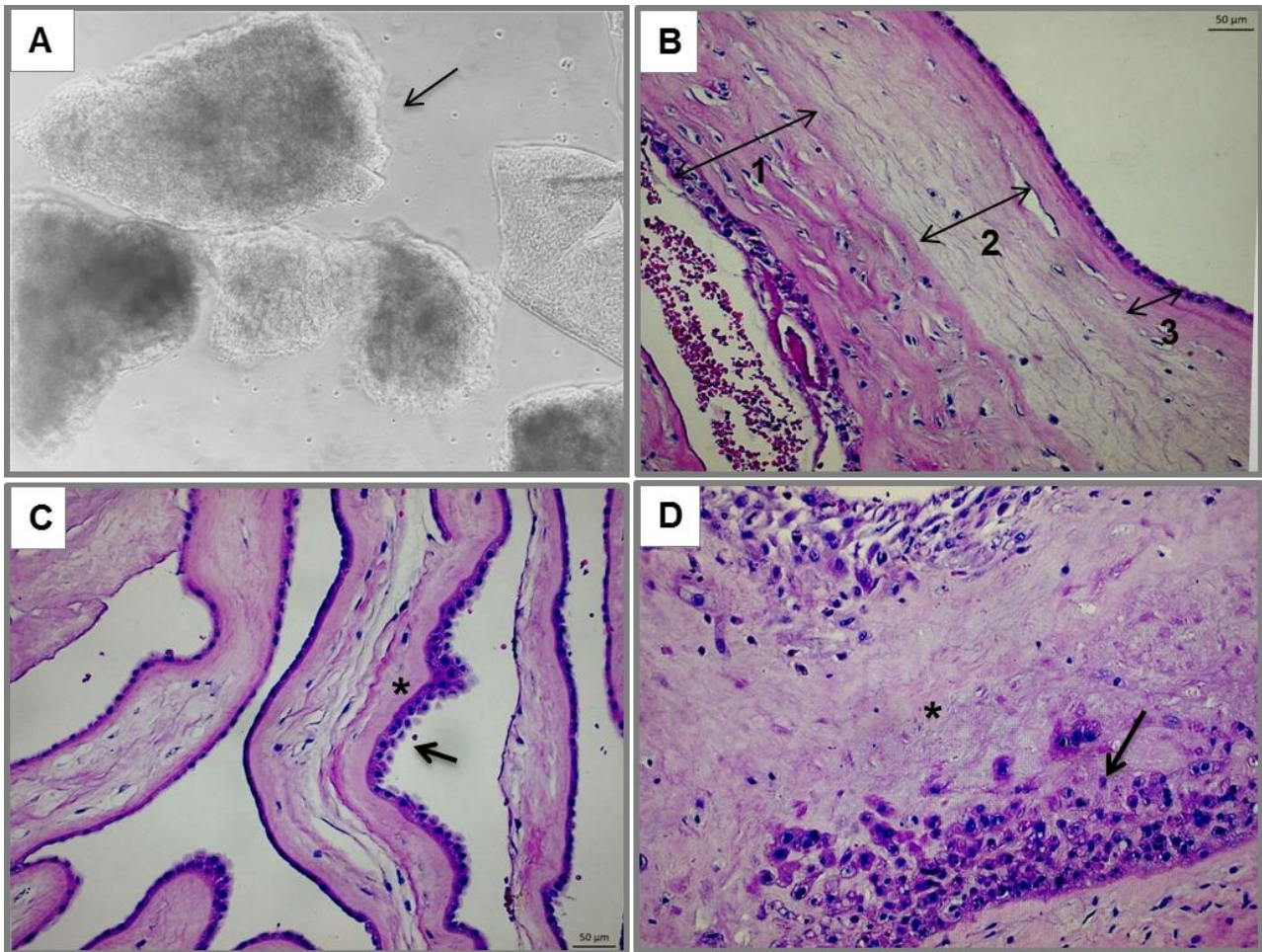


Figura 4.4: **Explantos da membrana fetal de placenta humana a termo:** membrana fetal amniocoriônica em cultivo (seta) foi observado por microscopia de contraste de fase (A) e cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (H&E) (B-D). (B) 1. membrana fetal coriônica, com capilares, voltada para o tecido materno, 2. tecido esponjoso intermediário e 3. membrana fetal amniônica avascular voltada para o feto; (C) membrana fetal amniônica com células epiteliais cubóides (seta) e mesoderme com fibroblastos e células mesenquimais amnióticas (asterisco) e (D) membrana fetal coriônica, com células coriônicas (seta) e mesoderme com fibroblastos e células mesenquimais coriônicas (asterisco).



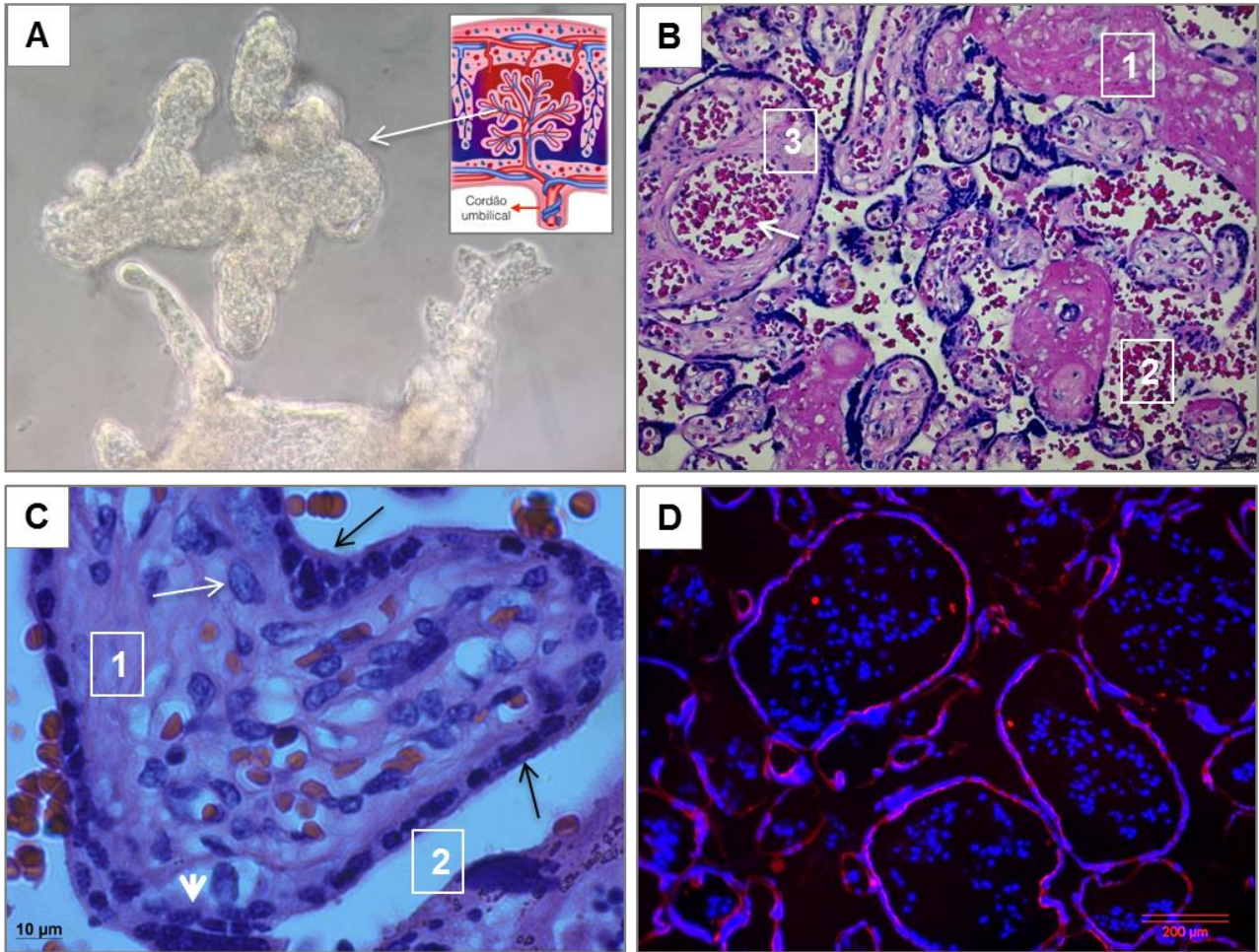


Figura 4.5: **Explantes das vilosidades coriônicas de placenta humana a termo:** das vilosidades coriônicas em cultivo (seta) observadas por microscopia de contraste de fase (A) e cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (H&E) (B e C). (B) 1. tecido fibrinóide, 2. espaço interviloso e 3. tecido fetal com capilares fetais (seta). (C) 1. mesoderma fetal com células mesenquimais, fibroblastos e macrófagos fetais (seta branca), sincitiotrofoblasto (seta preta longa) e citotrofoblasto (cabeça de seta branca), 2. espaço interviloso. (D) vilosidade coriônica imunofenotipada com o marcador citoqueratina -7 (CK-7) em vermelho evidenciando células trofoblásticas e DAPI em azul para visualização do núcleo celular.

#### 4.3.2. Caracterização Fenotípica e Detecção Antigênica por Imunofluorescência

A imunofenotipagem da membrana coriônica com o marcador citoqueratina -7 (CK-7) evidencia filamentos intermediários em vermelho nas células epiteliais coriônicas (Fig. 4.6A), é possível observar a dupla marcação em vermelho e azul pelo DAPI, que evidencia o núcleo celular (Fig. 4.6B). As vilosidades coriônicas também foram imunomarcadas pelo anticorpo anti-CK-7 (Fig. 4.6D) e a dupla marcação (Fig. 4.6E).

Com a finalidade de investigar a susceptibilidade dos explantes em cultivo de placenta a termo, membrana e vilosidades coriônicas foram infectadas com  $1 \times 10^6$  PFU/ml ZIKV por 72h (Fig. 6C e F). Após este período, a proteína do envelope viral foi detectada pela incubação com o anticorpo 4G2. Foi possível observar intensa marcação do antígeno viral em verde em ambos tecidos (Fig. 6C e F). A marcação antigênica nas vilosidades parece não estar localizada nas células trofoblásticas CK-7+. Desta forma, foram conduzidos ensaios pela marcação com o anticorpo anti-vimentina em vermelho, que excluem células epiteliais e marcam fibroblastos e células mesenquimais (Fig. 4.7A, B e F). O explante foi infectado pelo ZIKV por 48h com  $1 \times 10^6$  PFU/ml, esta condição experimental de diminuir o tempo de infecção e manter a carga viral levou a uma infecção qualitativamente mais moderada (Fig. 7C, D e F) em comparação a observada anteriormente (Fig. 6F). De fato, observando a tripla marcação pelo 4G2, vimentina e DAPI, é possível verificar a coloração laranja obtida pela colocalização da marcação da vimentina e da proteína viral, o que mais uma vez sugere que a infecção no tecido das vilosidades de placenta a termo não ocorra nos trofoblastos (Fig. 7F). No entanto, para obtenção de melhores imagens que possam confirmar esses achados é preciso analisar essas amostras por Microscopia Confocal a Laser, além de conduzir ensaios para análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão.

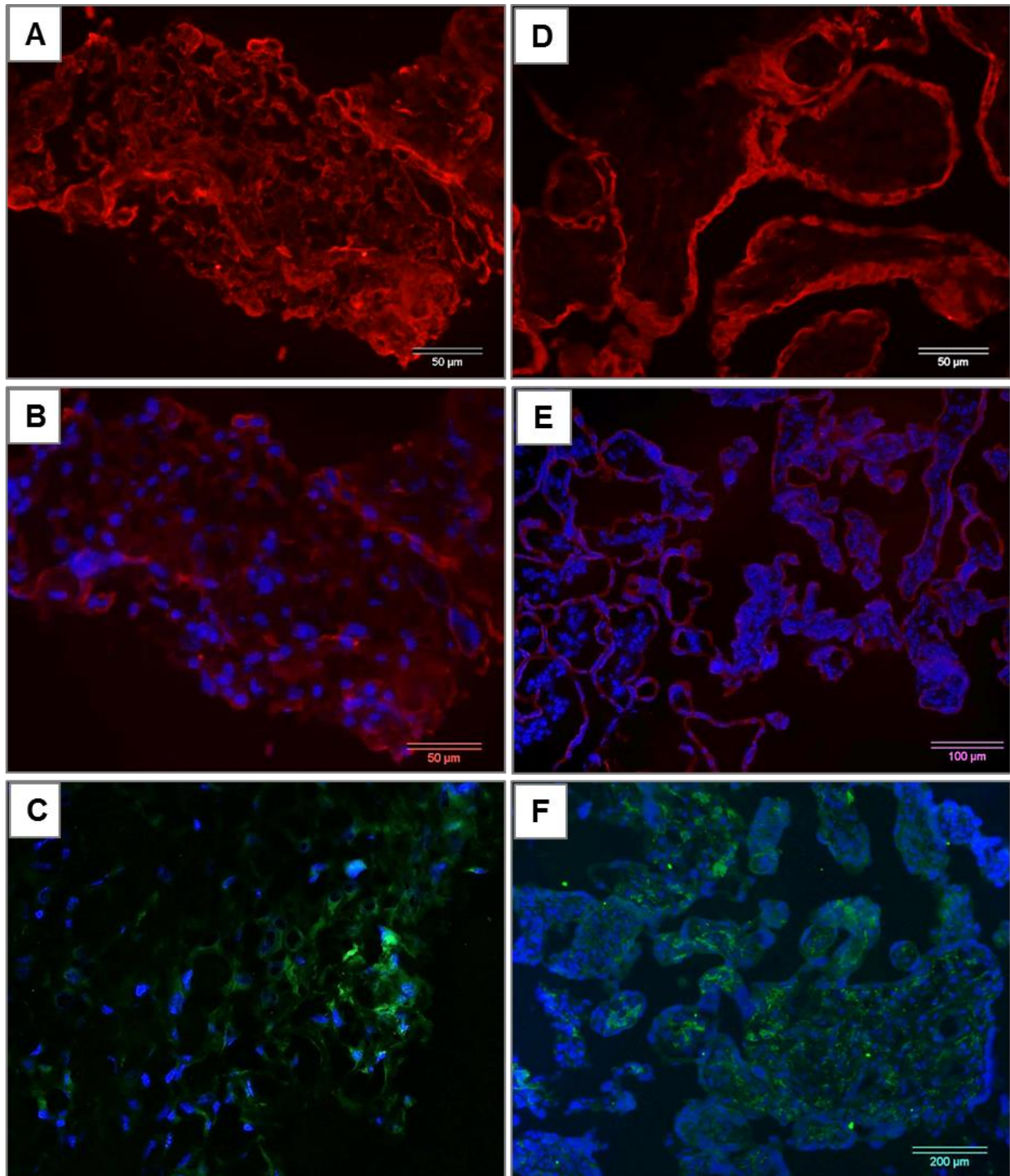


Figura 4.6: **Imunofenotipagem por CK-7 e Detecção do antígeno viral em explantes por imunofluorescência:** membrana fetal coriônica (A-C) e vilosidade coriônica (D-F) foram cultivadas na presença de Mock e imunofenotipadas em vermelho (A-B e D-E) ou infectadas pelo ZIKV infectadas (C e F) por 72 h com  $1 \times 10^6$  PFU/ml, onde é possível observar a marcação da proteína E viral em verde (anticorpo primário 4G2 e secundário AlexaFluor 488) e em azul (DAPI) a marcação do núcleo celular.

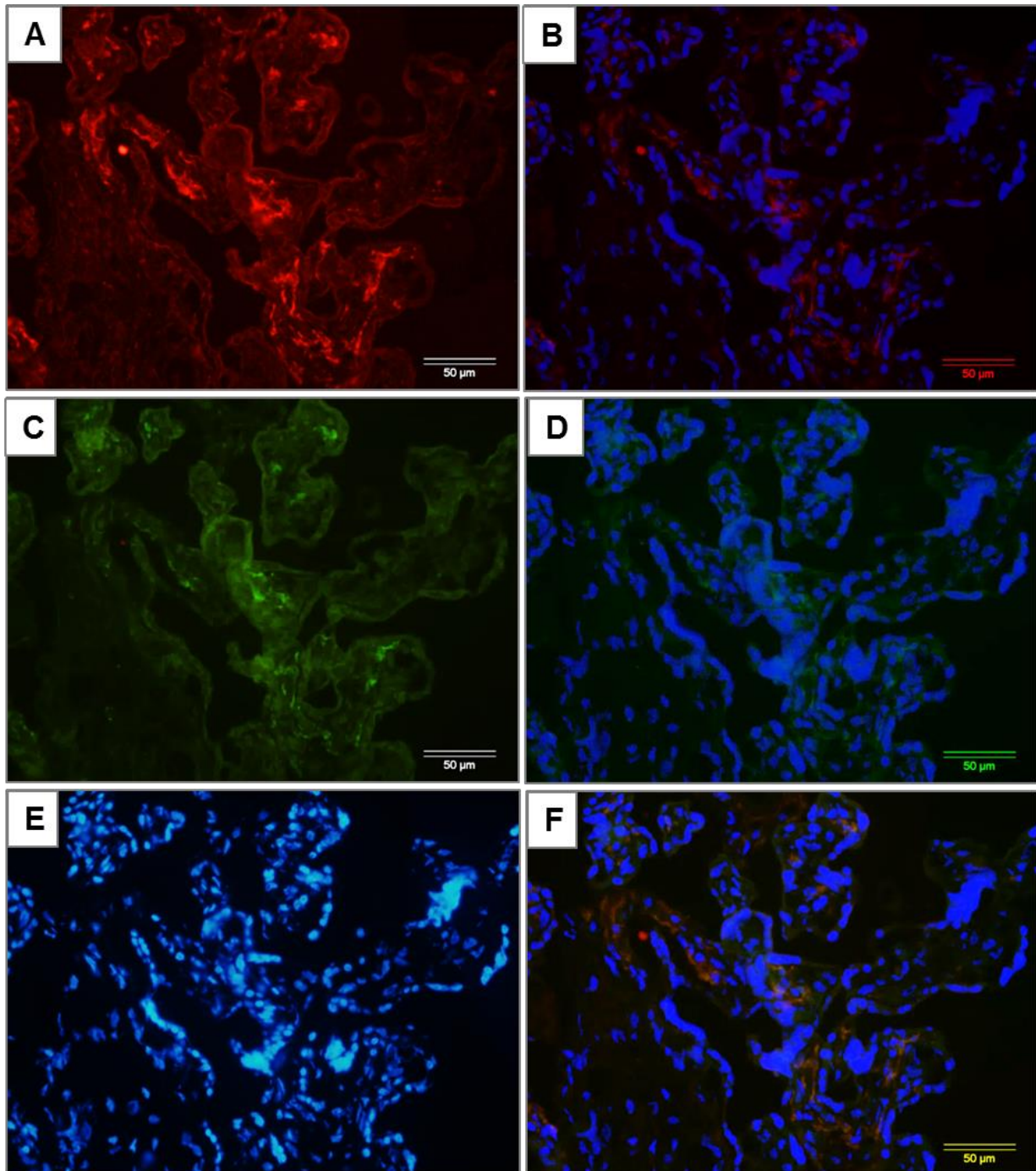


Figura 4.7: **Imunofenotipagem por vimentina e Detecção do antígeno viral em explantes de vilosidade coriônica por imunofluorescência:** O explante foi infectado pelo ZIKV por 48h com  $1 \times 10^6$  PFU/ml. **(A)** imunofenotipagem pelo marcador vimentina em vermelho e **(B)** dupla marcação com vimentina e DAPI em azul, **(C)** marcação da proteína E viral em verde (anticorpo primário 4G2 e secundário AlexaFluor 488) e **(D)** dupla marcação do antígeno viral e DAPI. **(E)** marcação pelo DAPI e **(F)** tripla marcação pelo 4G2, vimentina e DAPI. Note em laranja em **(F)** a colocalização da marcação por vimentina e antígeno viral.

#### **4.4. Obtenção e Caracterização Morfológica e Fenotípica das Culturas Primárias de Placenta Humana**

##### 4.4.1. Isolamento de células da membrana fetal e da vilosidade coriônica

Paralelo ao cultivo dos explantes de placenta, foram realizados protocolos de dissociação das células primárias da membrana fetal amniótica e coriônica (Fig. 1.19; Fig. 4.8). Células amnióticas foram mais resistentes ao processo de digestão enzimática comparado as células coriônicas, por isso foram submetidas ao ciclo de dissociação por 40 min/37°C, enquanto a membrana coriônica foi incubada por apenas 20 min/37°C. Mesmo submetendo o tecido coriônico ao menor tempo de incubação, esta maior sensibilidade refletiu nos percentuais de viabilidade e rendimento celular. Enquanto foi possível obter o rendimento total de  $9 \times 10^6$ /mL de células amnióticas com 91% de viabilidade (Fig. 4.8A), esses valores para células coriônicas foram de  $4.6 \times 10^6$ /mL com 72% de viabilidade (Fig. 4.8B). Para o isolamento das células da vilosidade coriônica, os explantes foram submetidos a 0.1% de tripsina por 10 min/37°C e cultivados em placas de cultura. De fato, com o acompanhamento das culturas foi possível observar a reorganização dos explantes em esferoides e proliferação de células formando a monocamada (Fig. 4.8C). Desse modo, dentre muitas dissociações realizadas apenas cerca de 10% apresentaram boa viabilidade e, portanto boa adesão celular e puderam ser utilizadas para execução dos ensaios experimentais.

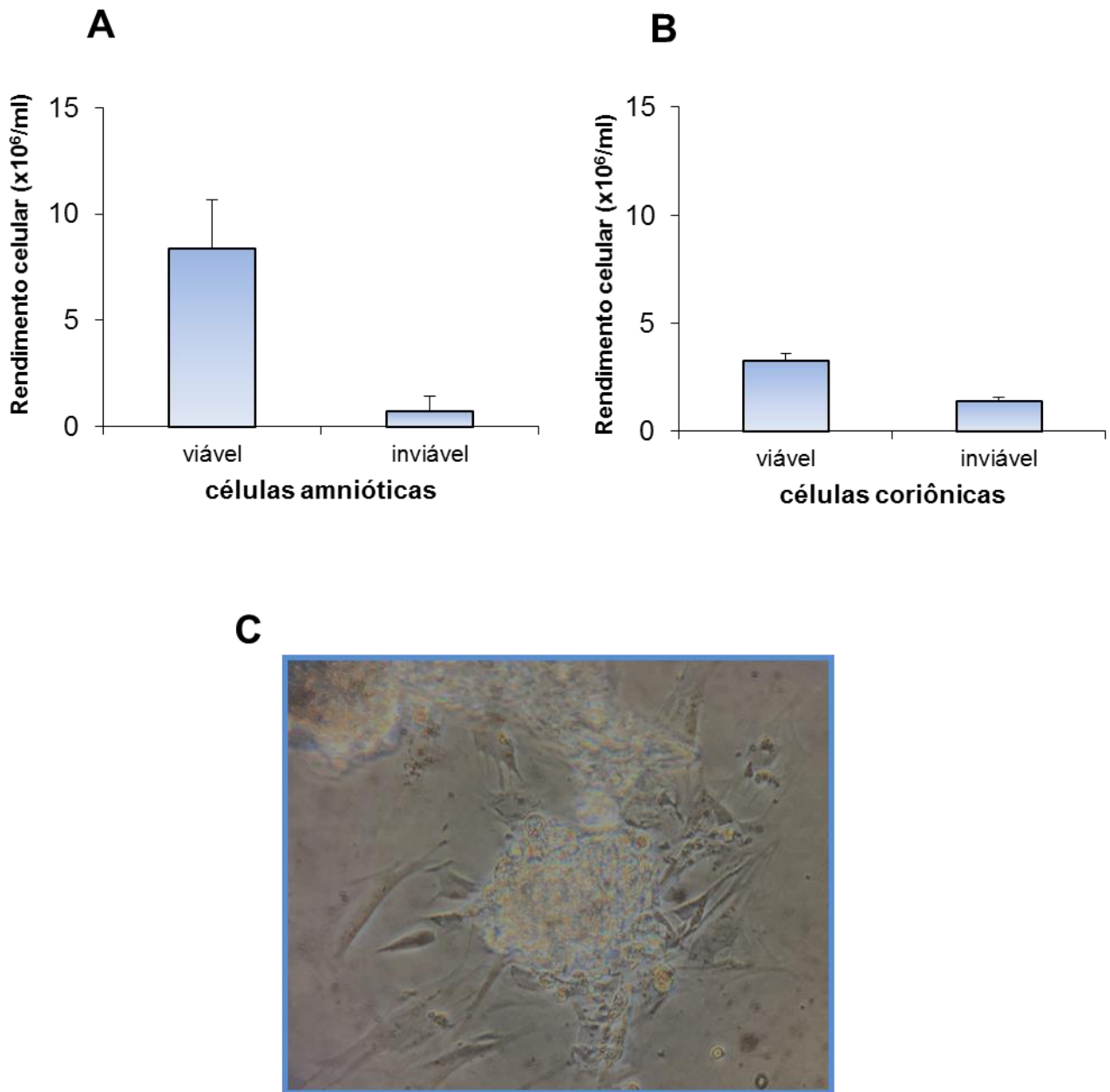


Figura 4.8: **Obtenção de células da membrana fetal e vilosidade coriônica:** viabilidade e rendimento de células primárias após dissociação de células amnióticas (A) e células coriônicas (B), e isolamento de células de explantes da vilosidade coriônica que formam esferóides e monocamada celular (C).

#### 4.4.2. Células amnióticas

Notada as diferenças de viabilidade e rendimento entre os tipos celulares, o crescimento das culturas também foi acompanhado e revelou importantes diferenças. As culturas de células amnióticas foram acompanhadas até 20 dias após sua obtenção (Fig. 4.9A-D). Com aproximadas 18h de cultivo já foi possível observar células diferenciadas (Fig. 4.9A, seta). A semiconfluência só foi observada após 10 dias de cultivo (Fig. 4.9B) e a confluência total após 20 dias (Fig. 4.9C). Importaneamente, este tipo celular se manteve viável após pelo menos 3 passagens em cultivo (Fig. 4.9D), no entanto, a cada passagem o crescimento celular se tornou mais lento, o que indica a necessidade de adição ao meio de cultivo de fatores de crescimento, como EGF, para maior proliferação celular. Além disso, as células resistiram ao procedimento de criopreservação (toxicidade do meio de congelamento (10% DMSO), mudança de temperatura e retorno do metabolismo celular), indicando a possibilidade da criação de um repositório de células primárias obtidas de placenta a termo (Fig. 4.9E). As culturas primárias foram caracterizadas morfológica e fenotipicamente. As células amnióticas, de origem epitelial exibiram extrema homogeneidade morfológica, com característica poligonal, ao longo do cultivo primário (Fig. 9C-E e Fig. 9B-D).

A imunofenotipagem foi realizada através do marcador CK-7 (Fig. 10) que mostrou 100% de homogeneidade celular (Fig. 10B-D), em maior aumento é possível visualizar em detalhe os filamentos intermediários (Fig. 10D, seta).

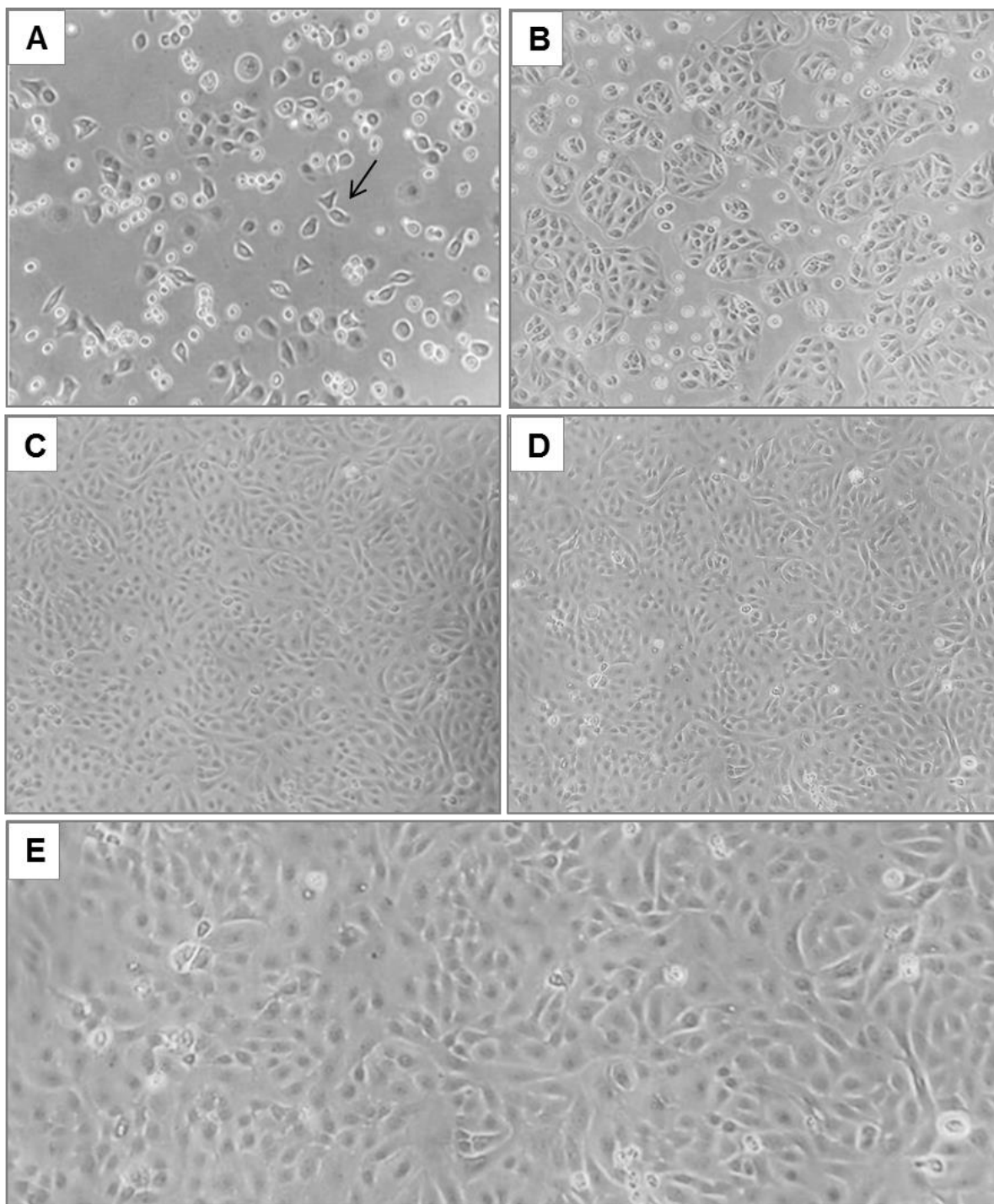


Figura 4.9: **Cultura primária de células amnióticas obtidas da membrana fetal:** microscopia de contraste de fase das células dissociadas com solução de digestão enzimática (0.1% tripsina e 100 µg/mL DNase I) por 40 min./37°C, cultivadas e acompanhadas por: 1 dia (A), 10 dias (B), 20 dias de cultivo (C) e 4 semanas de cultivo após a 1º passagem (D). Cultivo após criopreservação em maior aumento permitindo melhor visualização da homogeneidade morfológica (E).



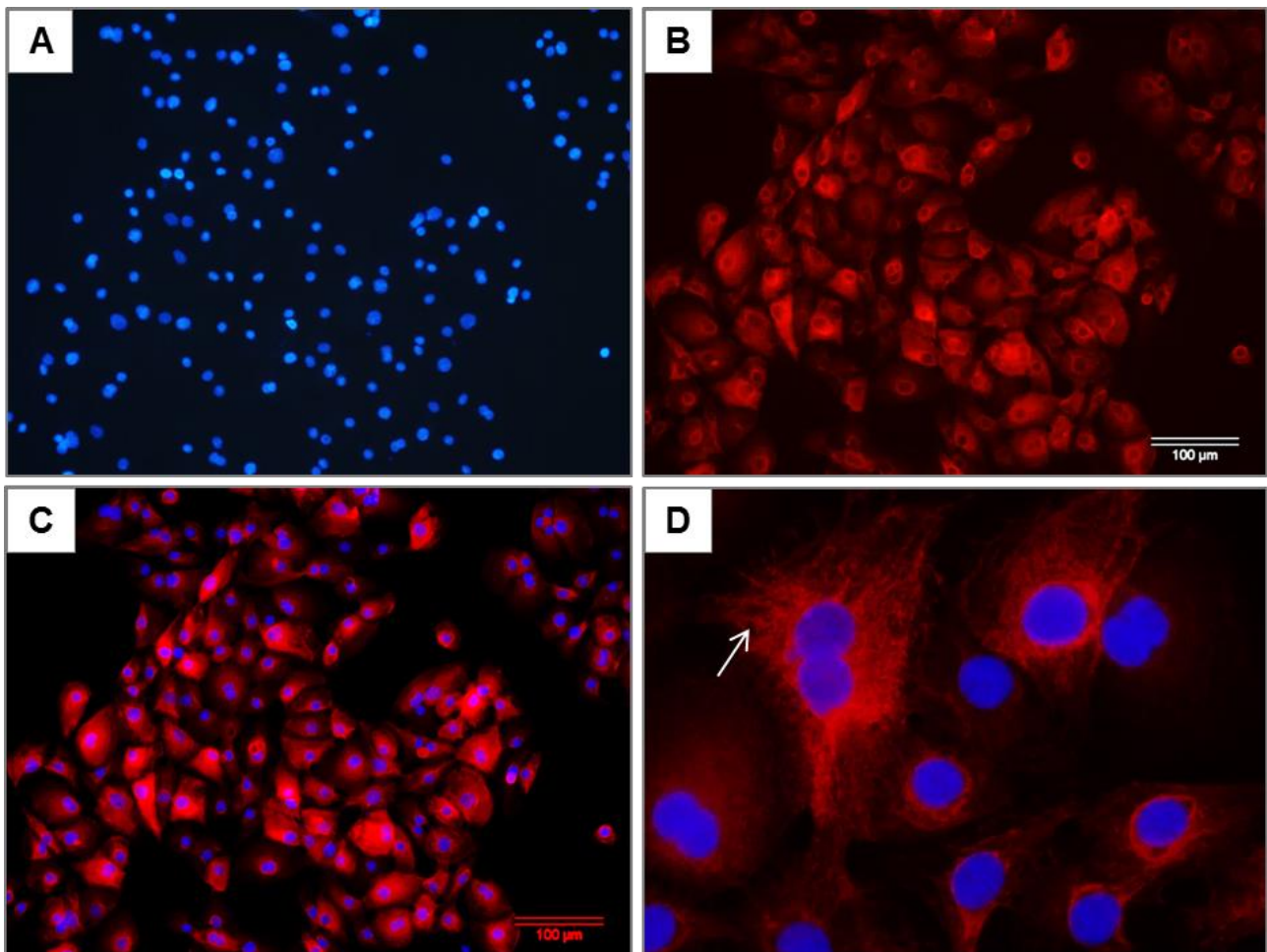


Figura 4.10: **Cultura primária de células amnióticas obtidas da membrana fetal:** caracterização fenotípica através do marcador de filamentos intermediários CK-7, característico de células epiteliais. **(A)** DAPI em azul para marcação do núcleo celular. **(B)** imunofenotipagem com o marcador CK-7 em vermelho. **(C)** dupla marcação CK-7 e DAPI. **(D)** em maior aumento (objetiva 100X) dupla marcação por CK-7 e DAPI para melhor visualização dos filamentos intermediários.

#### 4.4.3. Células coriônicas

Apesar dos altos índices de perda da viabilidade celular (28%) (Fig. 4.8B) após o isolamento, as células coriônicas apresentaram excelente crescimento, atingindo semiconfluência e confluência após 5 e 15 dias de cultivo, respectivamente (Fig. 4.11B e C). Estas células também resistiram ao procedimento de tripsinização em cultivo e a criopreservação. Em apenas 10 dias após a primeira passagem formaram uma monocamada fechada (Fig. 4.11D). No entanto, as culturas de células coriônicas não

exibiram a mesma homogeneidade das células amnióticas, talvez este fato esteja relacionado ao rendimento celular e tempo de cultivo. Para demonstrar estas características tanto em relação a morfologia quanto a fenotipagem, foram analisadas culturas de diferentes placentas (Fig. 4.12, 4.13 e 4.14). Foram observadas culturas mistas, com células CK-7+ e negativas para o marcador (Fig. 4.12B). Quando as células epiteliais CK-7+ são obtidas em maior número, de fato elas predominam ao longo do cultivo (Fig. 4.13). Por outro lado, algumas culturas ao longo do cultivo foram 100% vimentina positiva (Fig. 4.14B-D), apresentando uma morfologia predominantemente fusiforme (Fig. 4.14C, seta) e filamentos intermediários organizados.

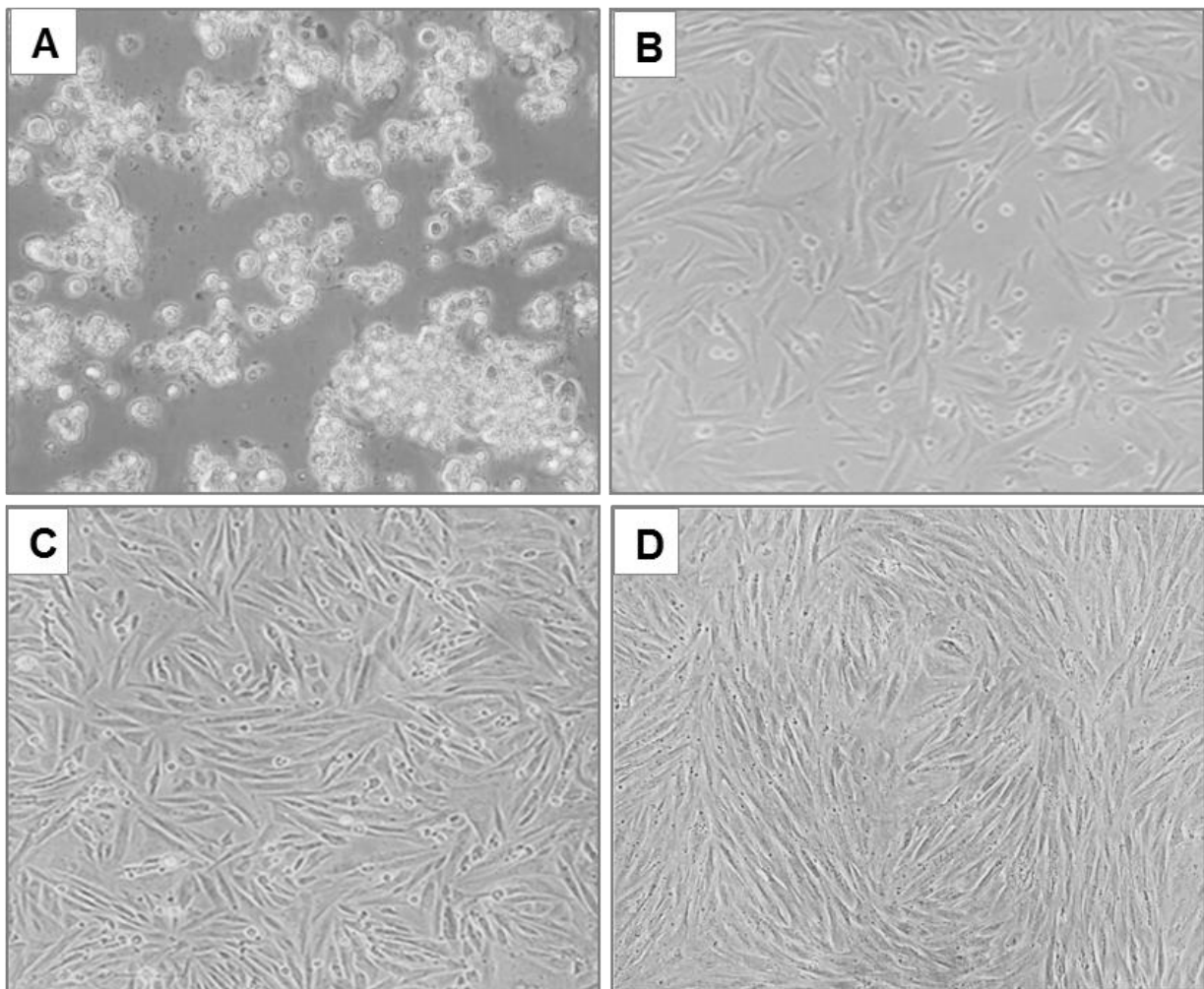


Figura 4.11: **Cultura primária de células coriônicas obtidas da membrana fetal:** microscopia de contraste de fase das células dissociadas com solução de digestão enzimática (0.1% tripsina e 100 µg/mL DNase I) por 20 min./37°C, cultivadas e acompanhadas por: 1 dia (A), 5 dias (B), 15 dias de cultivo (C) e 10 dias de cultivo após a 1° passagem (D).

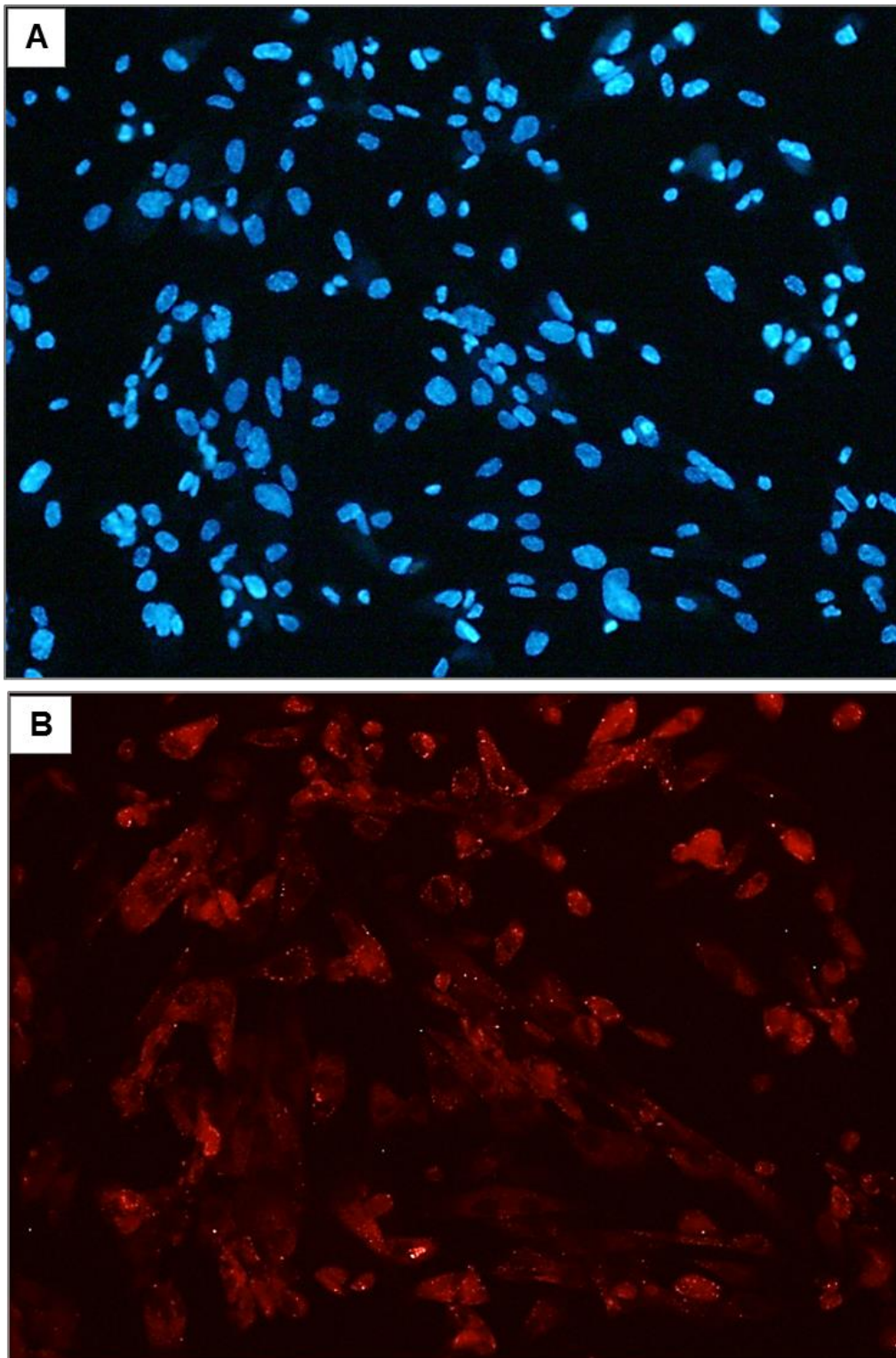


Figura 4.12: **Cultura primária de células coriônicas obtidas da membrana fetal:** caracterização fenotípica através do marcador CK-7. **(A)** DAPI em azul para marcação do núcleo celular. **(B)** imunofenotipagem com o marcador CK-7 em vermelho.

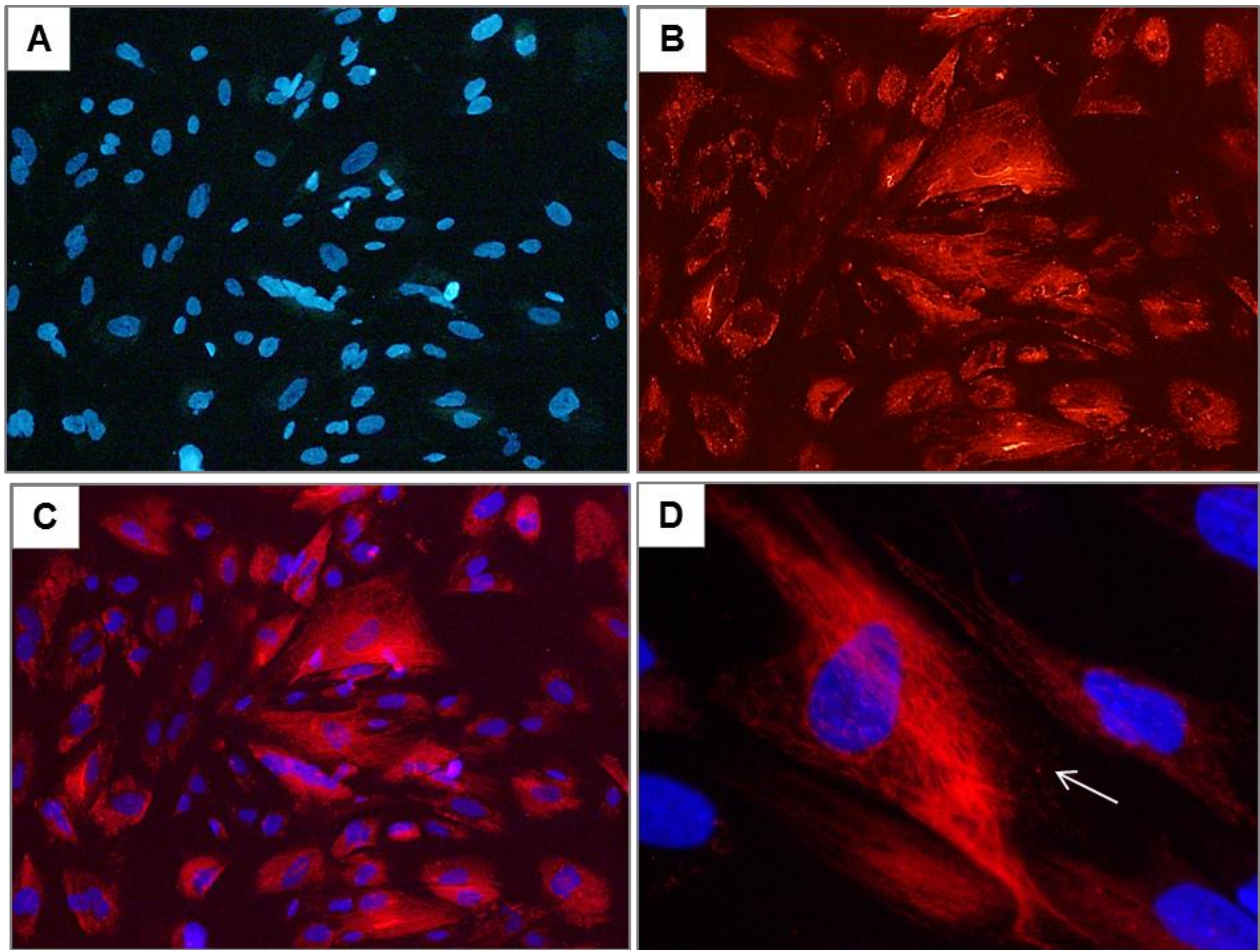


Figura 4.13: **Cultura primária de células coriônicas obtidas da membrana fetal:** caracterização fenotípica através do marcador CK-7. **(A)** DAPI em azul para marcação do núcleo celular. **(B)** imunofenotipagem com o marcador CK-7 em vermelho. **(C)** dupla marcação CK-7 e DAPI. **(D)** em maior aumento (objetiva 100x) dupla marcação por CK-7 e DAPI para melhor visualização dos filamentos intermediários.

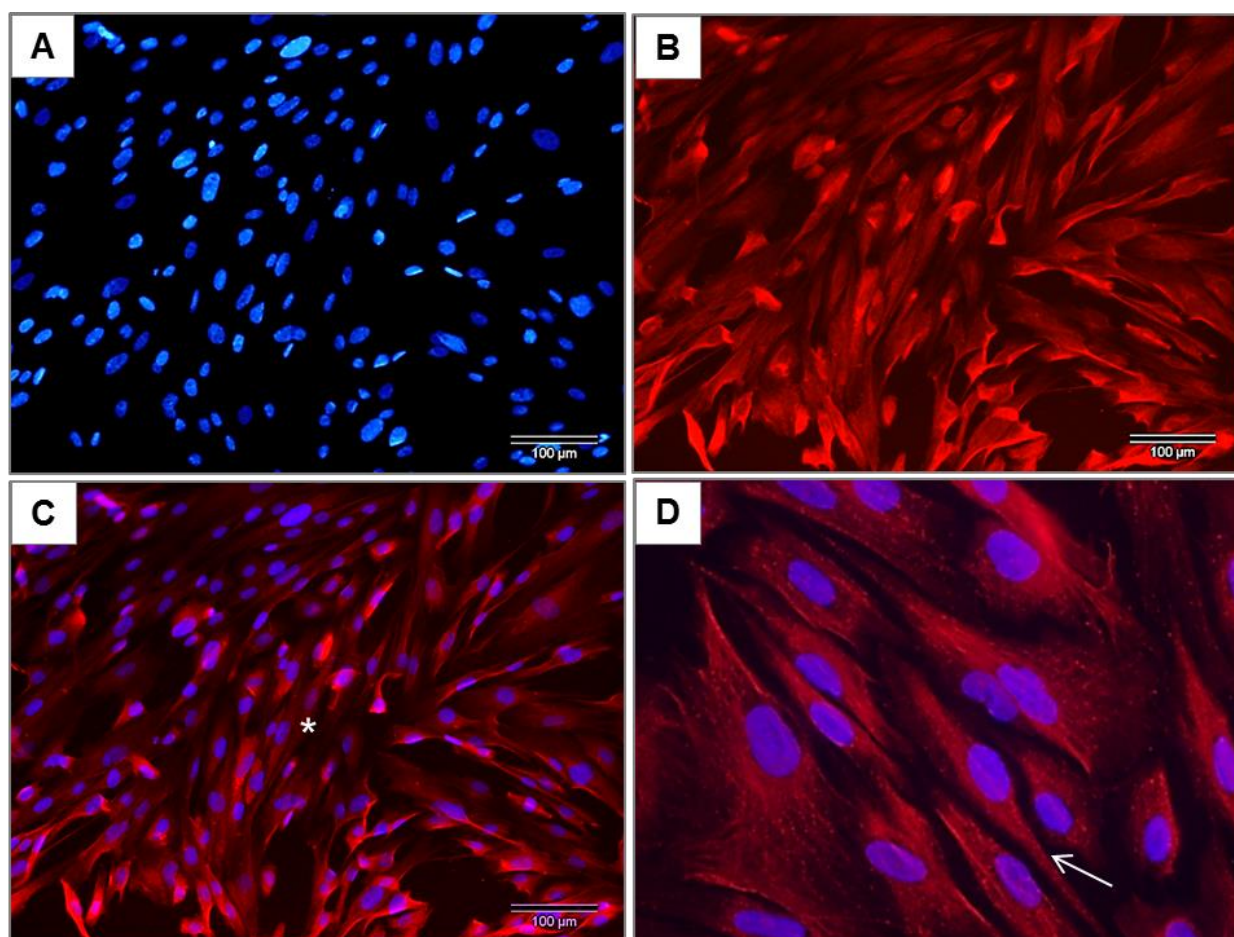


Figura 4.14: **Cultura primária de células coriônicas obtidas da membrana fetal:** caracterização fenotípica através do marcador de vimentina, que exclui células epiteliais. **(A)** DAPI em azul para marcação do núcleo celular. **(B)** imunofenotipagem com o marcador vimentina em vermelho. **(C)** dupla marcação vimentina e DAPI. **(D)** em maior aumento (objetiva 100x) dupla marcação por vimentina e DAPI para melhor visualização desta outra classe de filamento intermediário.

#### 4.4.4. Células das vilosidades coriônicas

Após a coleta das vilosidades coriônicas, explantes foram submetidos a curta ação enzimática, cultivados e acompanhados até 20 dias de cultivo, de acordo com o protocolo de Kolokoltsova e colaboradores (2017). Com 5 dias de cultivo foi observado a ocorrência da primeira etapa do crescimento celular pelo brotamento de um grupo de sincício (Fig. 4.15A, asterisco) e organização deste tecido em esferóides após 10 dias de cultivo (Fig. 4.15B, seta), com formação de monocamada de células proliferativas exibindo diferentes morfologias (Fig. 4.15B-F), estrelada com citoplasma volumoso (Fig. 4.15E, seta branca) e fibroblastóide (Fig. 4.15E, seta preta). Foram observadas algumas células polinucleadas, sugerindo que citotrofoblastos tenham proliferado e diferenciado em sinciciotrofoblasto por fusão celular (Fig. 4.15E, asterisco). Para os ensaios de fenotipagem, foi realizado o processo de tripsinização e replaqueamento das culturas de esferóides e células em monocamadas (Fig. 4.16 e Fig. 4.17). Após o replaqueamento, as células aderentes não apresentaram marcação CK-7+ (Fig. 4.16B-C e E), sendo 100% vimentina positivas (Fig. 4.17B-D e F). Estes resultados não foram relacionados a composição celular dos esferóides aderentes, uma vez que foram formados com  $31\pm 8\%$  de células CK-7+ (Fig. 4.16E) e  $68\pm 8\%$  de células vimentina positivas (Fig. 4.17F), em relação ao número total marcadas por DAPI (Fig. 4.16D e Fig. 4.17E). Já havia sido mostrado que as vilosidades coriônicas apresentam um epitélio composto por células trofoblásticas CK-7+ (Fig. 4.6D), bem como um tecido interno formado por células vimentina positivas (Fig. 4.7A e B). Essa quantificação foi realizada pelo *Software Cell Profiler™* (*cell imagen analysis software*). O programa, permite a análise de imagens em alto rendimento através da identificação e quantificação de diferentes fenótipos celulares, particularmente aqueles obtidos através da microscopia de fluorescência.

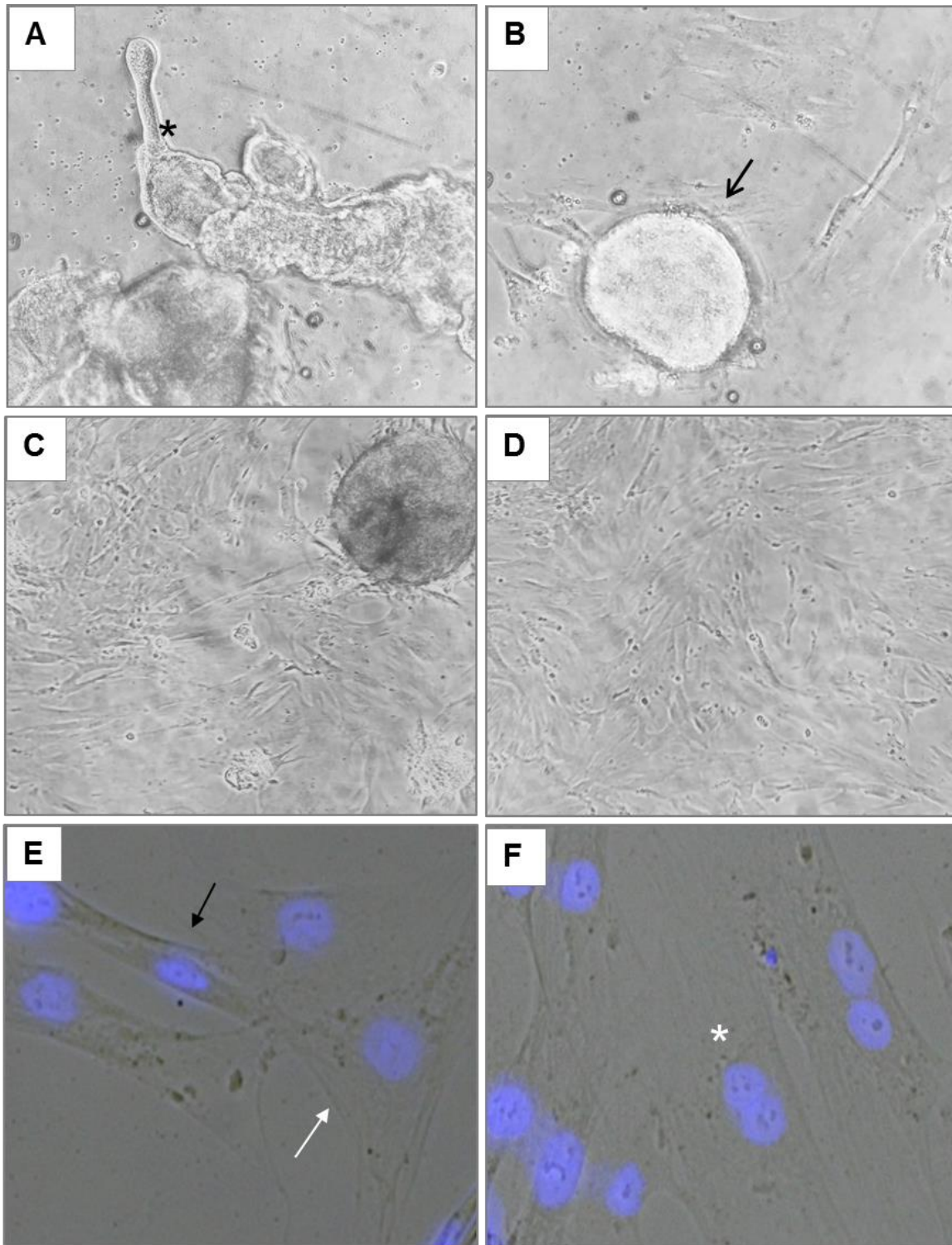


Figura 4.15: **Cultura de explantes de vilosidade coriônica:** Os Explantes foram submetidos a solução digestão enzimática por 10 min./37°C, cultivados e acompanhados por: 5 dia (A), 10 dias (B), 15 dias (C) e 20 dias de cultivo (D). (E e F) mostra as diferentes morfologias das células que proliferaram e formaram a monocamada, em E células com formato fusiforme (seta preta) e formato estrelado (seta branca), e em F sugestivo de citotrofblastos diferenciado em sinciotrofblasto por fusão celular (asterisco).

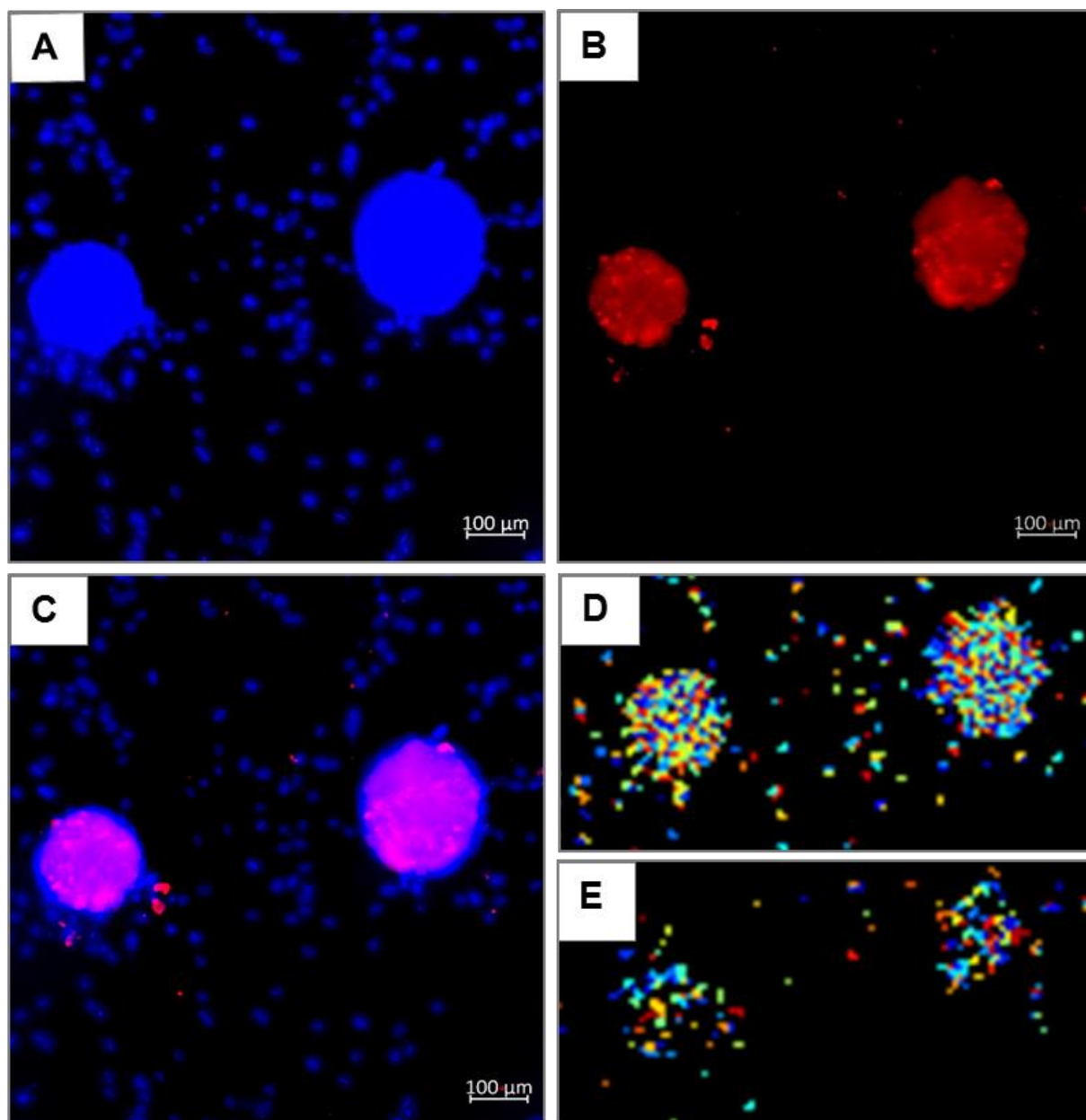


Figura 4.16: **Caracterização fenotípica por CK-7 dos esferóides e células proliferativas da vilosidade coriônica:** (A) imunomarcagem por DAPI em azul para visualização nuclear de células individualizadas e dos esferóides, (B) imunomarcagem por CK-7, característico de células epiteliais e (C) dupla marcação com anti-CK-7 e DAPI em azul. Quantificação de células totais nos esferóides através da marcação por DAPI (D) e CK-7 (E) através do *Software CellProfiler*.



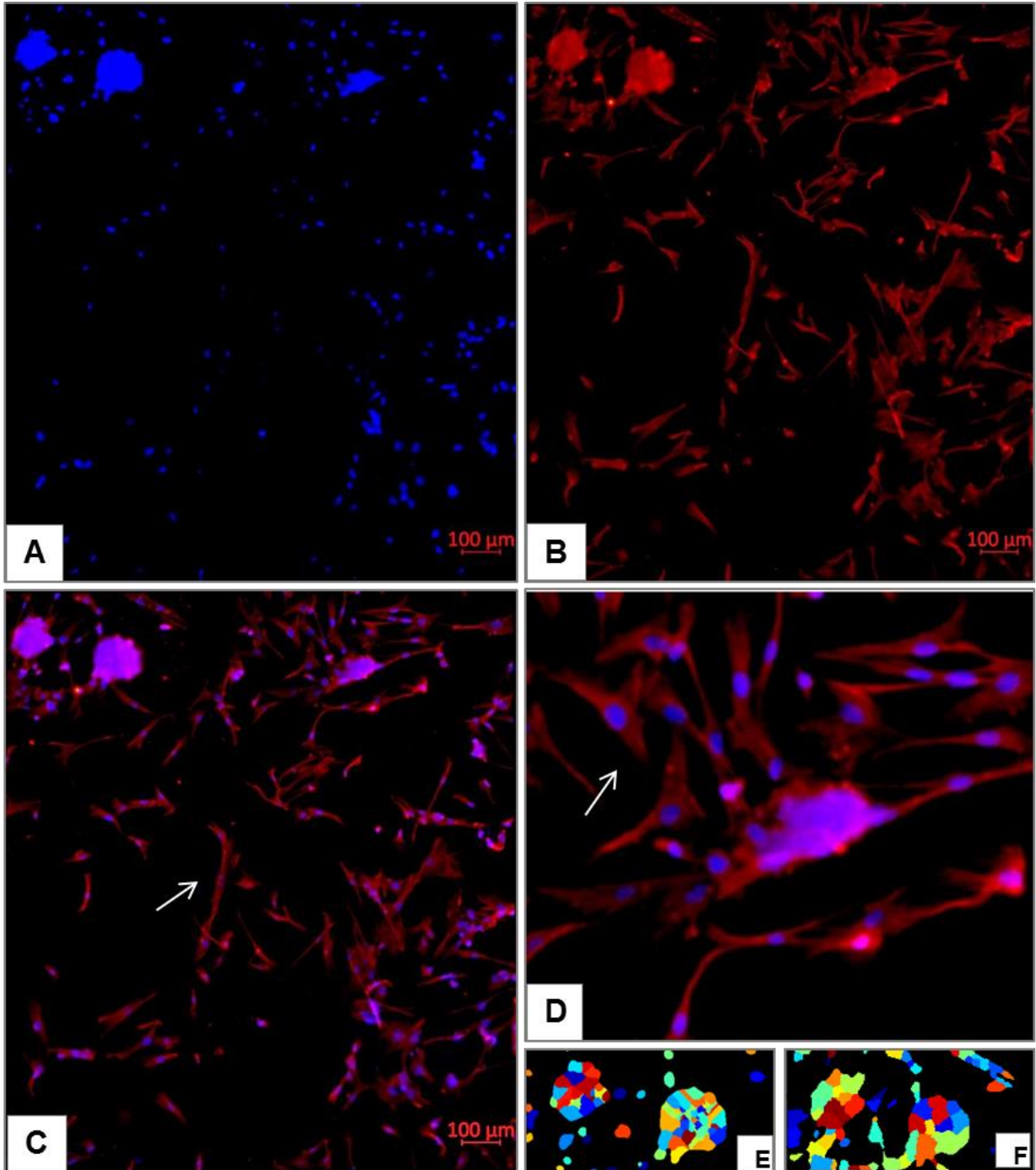


Figura 4.17: **Caracterização fenotípica por vimentina dos esferóides e células proliferativas da vilosidade coriônica:** (A) imunomarcagem por DAPI em azul para visualização nuclear de células individualizadas e dos esferóides, (B) imunomarcagem por vimentina, que exclui células epiteliais, (C) dupla marcação com anti-vimentina e DAPI em azul (seta, célula fibroblastóide) e (D). Maior aumento pra evidenciar células com formato estreadado (seta). Quantificação de células totais nos esferóides através da marcação por DAPI (E) e vimentina (F) através do *Software CellProfiler*.

## 4.5. Avaliação das infecções pelo ZIKV em Culturas de Células Primárias de Placenta Humana

### 4.5.1. Detecção de Antígeno Viral por Imunofluorescência

Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a infecção pelo ZIKV em explantes e células primárias de placenta a termo, identificar os tipos celulares permissivos a infecção por uma cepa viral brasileira e o percentual de susceptibilidade destes tipos celulares.

Esferóides e células que proliferam na monocamada apresentaram perfis diferentes de infecção com MOI 10 por 48 horas (Fig. 4.18). Culturas realizadas com placentas diferentes apresentaram morfologias distintas entre as células que proliferaram para formar a monocamada (Fig. 4.18A e C). Embora as células proliferativas formem uma monocamada mista, a cultura com predominância de células de formato estrelada (Fig. 4.18A, asterisco) não foram permissivas a infecção (Fig. 4.18B), no entanto, culturas com células apresentando predominância morfológica achatada (Fig. 4.18D, asterisco) apresentaram  $28\pm 3\%$  de células infectadas por ZIKV (Fig. 4.18D, asterisco), importante destacar o perfil de marcação do antígeno viral na região perinuclear, indicando intensa replicação viral no retículo endoplasmático (Fig. 4.18D, *inset*). Novos ensaios necessitam ser conduzidos para fenotipagem e identificação do tipo celular permissivo a infecção. Observamos infecção nos esferóides formados das vilosidades de ambas placentas (Fig. 4.18B e D, seta) e. O valor da quantificação realizada pelo *Software Cell Profiler*<sup>TM</sup> foi de  $47\pm 8\%$  de células infectadas nos esferóides (Fig. 4.18E1b e 2b) em comparação ao número de células totais marcadas com DAPI (Fig. 4.18E1a e 2a). Porém será necessário analisar essas amostras por microscopia confocal a laser para obtenção de imagens que possam auxiliar na identificação do tipo celular infectado.

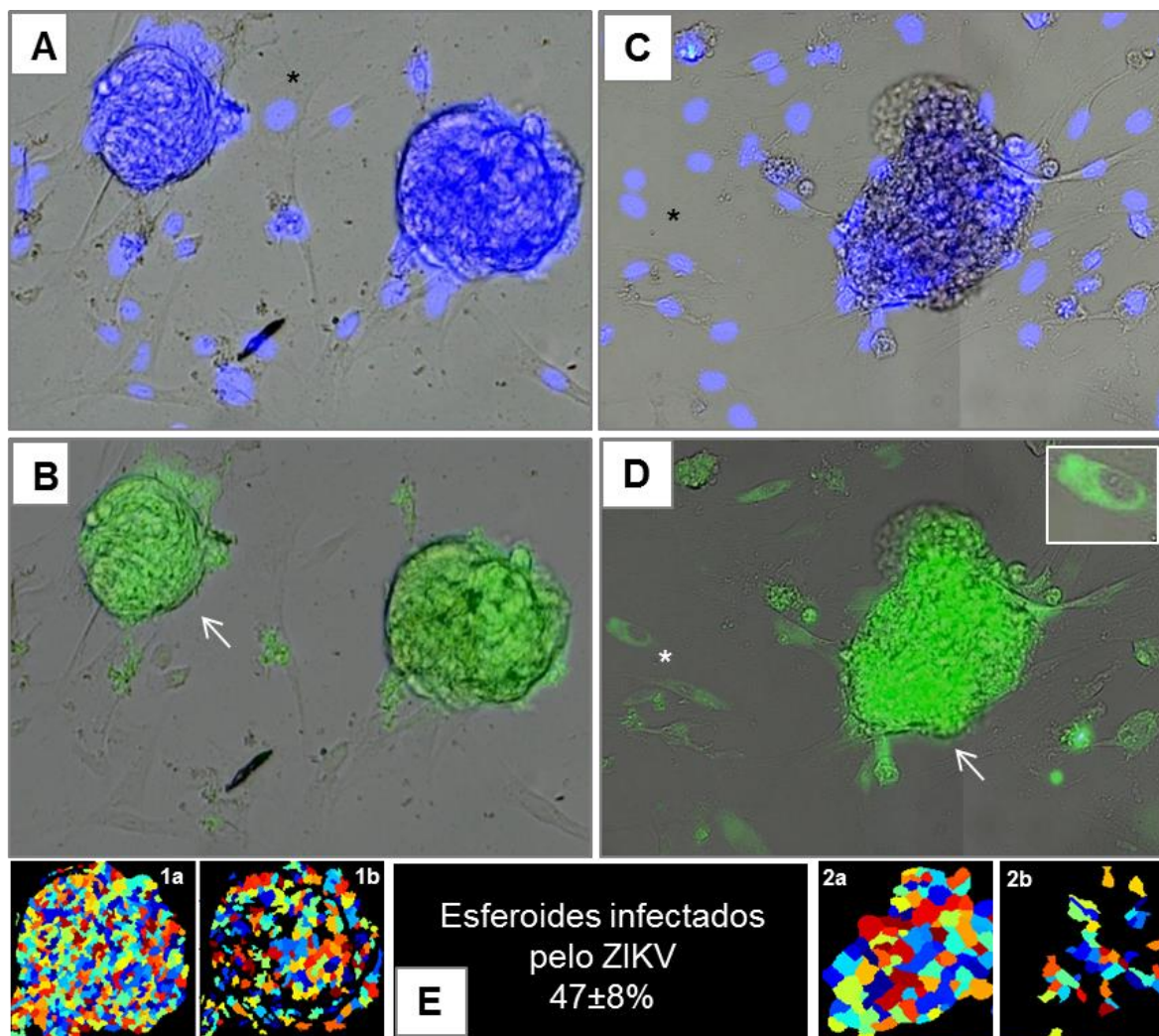


Figura 4.18: **Deteção do antígeno viral por imunofluorescência dos esferóides e células proliferativas da vilosidade coriônica:** as culturas foram infectadas pelo vírus Zika com a multiplicidade de infecção (MOI) 10 por 48 horas. **(A e D)** DAPI em azul para visualização do núcleo celular. **(B e E)** marcação do antígeno viral em verde com anticorpo 4G2. **(C)** tripla marcação em laranja com 4G2, vimentina e DAPI. **(F)** dupla marcação com 4G2 e DAPI. **(E)** Media  $\pm$  desvio padrão da quantificação de células dos esferoides pelo *Software CellProfiler*, através da marcação por DAPI **(E, 1a e 2a)** e antígeno ZIKV **(E, 1b e 2b)**.

Como dados da literatura apontam para altos perfis de infecção de células amnióticas pelo ZIKV, com o objetivo de comparar essa permissividade entre células da membrana fetal, ensaios foram realizados para acompanhamento da cinética de infecção em células primárias amnióticas e coriônicas frente à baixa carga viral (MOI 1) (Fig. 4.19-4.24).

As culturas de células amnióticas exibiram percentuais de células infectadas tempo-dependente, após 24h de infecção  $4.7 \pm 0.5\%$  de células exibiram marcação do antígeno viral,  $18 \pm 5.4\%$  em 48h e  $26.2 \pm 2.2\%$  em 72h de infecção (Fig. 4.19B-E). Importante destacar a especificidade do anticorpo pela ausência de marcação nas culturas Mock (Fig. 4.19A). Além disso, o RNA viral absoluto foi quantificado por RT-qPCR e os valores durante a cinética de infecção foram de  $8.4 \times 10^6$ ,  $50 \times 10^6$  e  $84 \times 10^6$  após 24h, 48h e 72h, respectivamente (Fig. 4.19F), confirmando os achados de detecção do antígeno viral de modo tempo-dependente. Após 48h, a infecção com a multiplicidade de infecção aplicada na cinética (MOI 1) foi demonstrada nas culturas imunofenotipadas com o marcador citoqueratina-7 (Fig. 4.20), onde é possível observar em laranja a colocalização de células ZIKV+ e CK-7+ (Fig. 4.20B, seta).

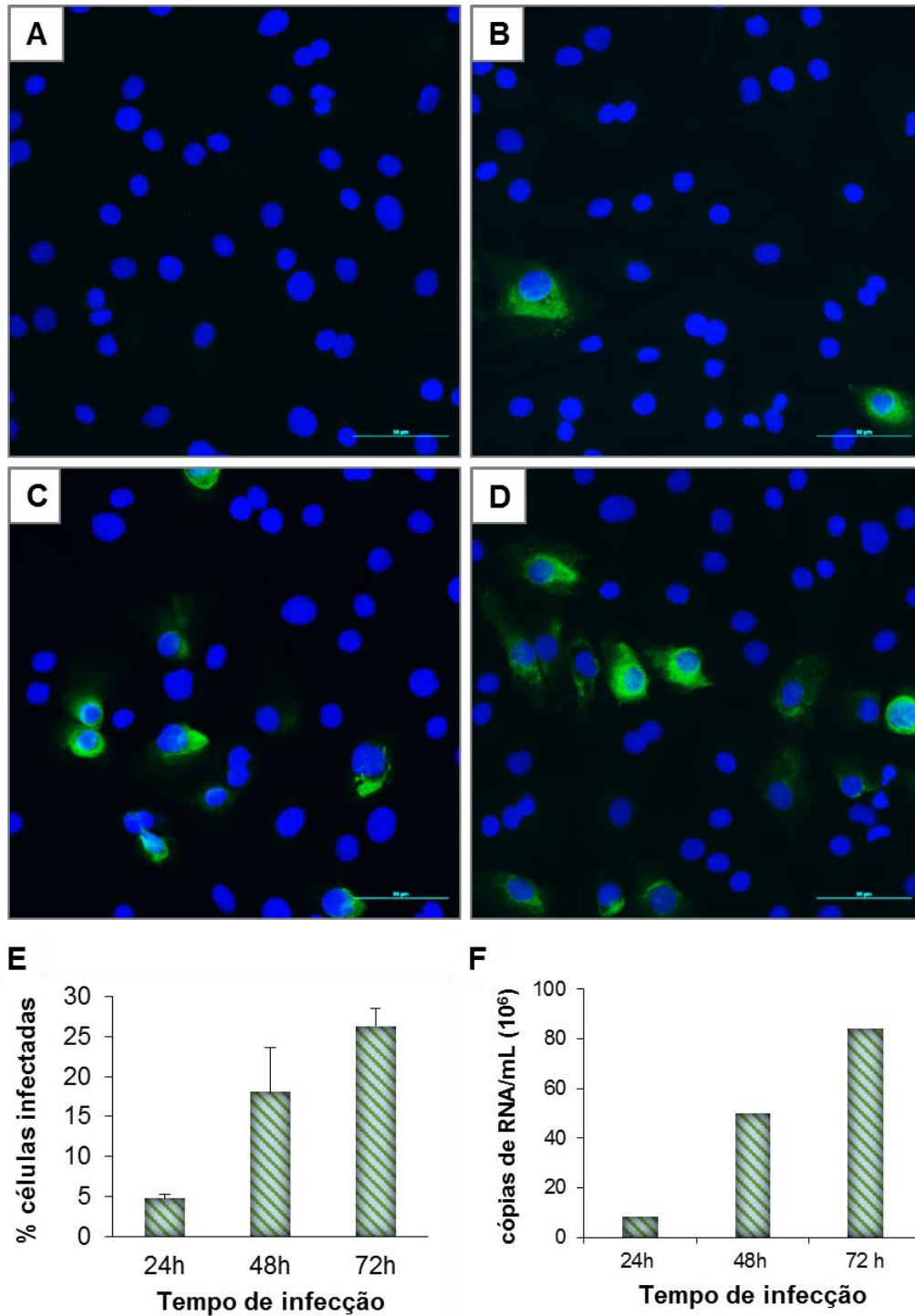


Figura 4.19: **Cinética de infecção de células primárias amnióticas frente à baixa carga viral:** as células foram cultivadas na presença de Mock (A) ou infectadas ZIKV (B-D) com a multiplicidade de infecção (MOI) 1 por (B) 24h, (C) 48h e (D) 72h. É possível observar a marcação da proteína viral em verde (anticorpo primário 4G2 e secundário AlexaFluor 488) e em azul a marcação do núcleo celular (DAPI). (E) O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão do percentual de células infectadas durante a cinética de infecção, n=5. (F) O gráfico representa o número de cópias de RNA viral de 1 ensaio experimental.

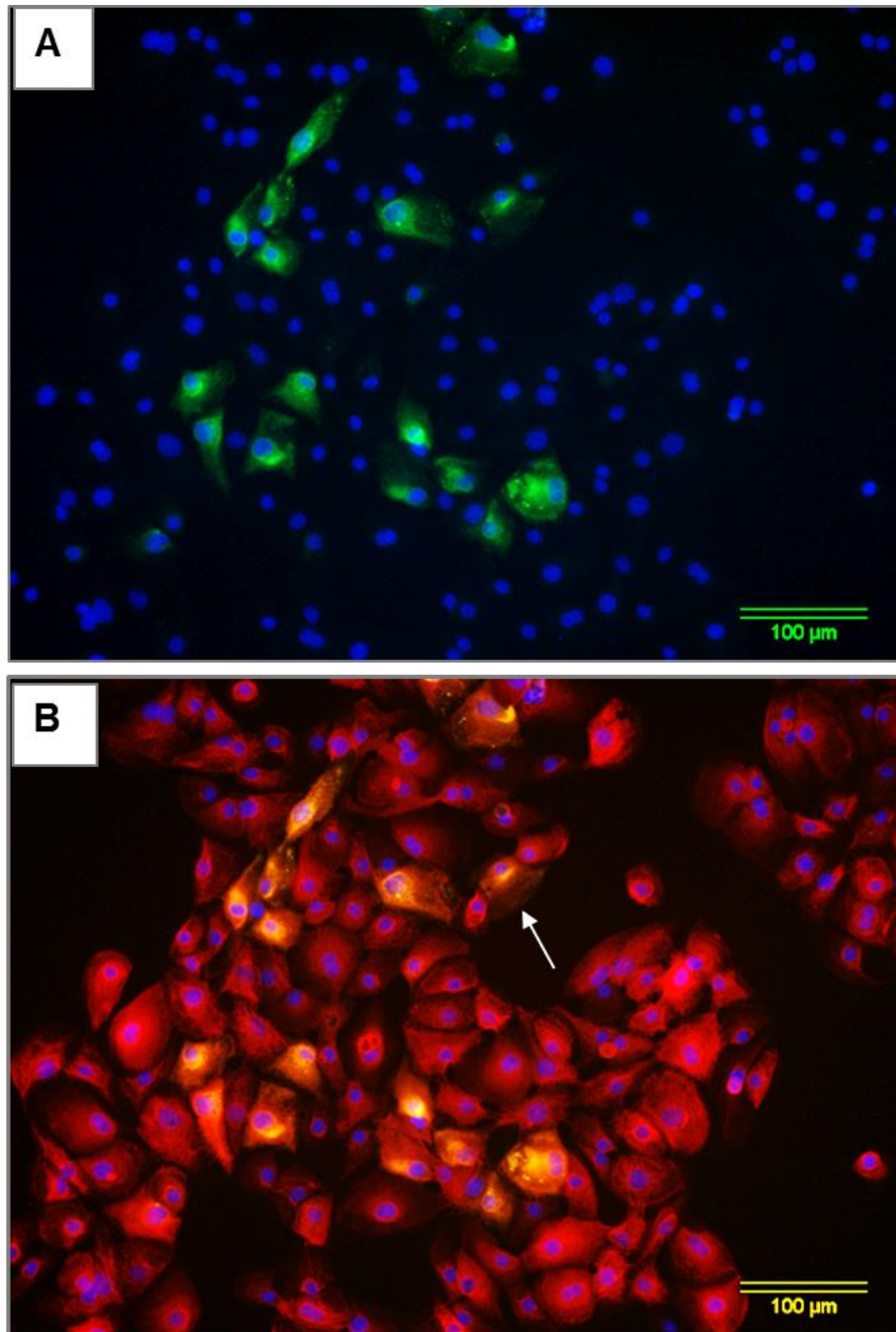


Figura 4.20: **Deteção do antígeno viral junto a caracterização fenotípica por CK-7 de células primárias amnióticas:** as culturas foram infectadas por ZIKV com a multiplicidade de infecção (MOI) 1 por 48h. **(A)** dupla marcação do antígeno viral em verde pelo anticorpo 4G2 e DAPI em azul e **(B)** imunofenotipagem com o marcador citoqueratina -7 (CK-7) em vermelho na tripla marcação com o 4G2 e DAPI. É possível observar em laranja a colocalização de células ZIKV+ e CK-7+ **(B, seta)**.

Como relatado anteriormente, as culturas de células coriônicas exibem morfologia e fenotipagem heterogêneas (Fig. 4.21 a 4.23). Este tecido é bem vascularizado (Fig. 4.4B, seta 1) e irrigado com sangue materno, apresentando uma estreita relação com as vilosidades coriônicas compostas pelo tecido fetal.

Portanto, células coriônicas CK-7+ (Fig. 4.21) foram infectadas com MOI 1 e acompanhadas por 24h (Fig. 4.21B), 48h (Fig. 4.21C) e 72h (Fig. 4.21D), alcançando valores de  $3.1 \pm 0.6\%$ ,  $11 \pm 0.7\%$  e  $12.8 \pm 2.2\%$ , respectivamente, de células marcadas com o antígeno viral (Fig. 4. 21B-E). Além disso, o RNA viral absoluto foi quantificado por RT-qPCR e os valores obtidos durante a cinética de infecção foram  $0.4 \times 10^6$ ,  $22 \times 10^6$  e  $50 \times 10^6$  após 24h, 48h e 72h, respectivamente (Fig. 4. 21B-E), confirmando os achados de detecção do antígeno viral de modo tempo-dependente. Quando culturas 100% vimentina+ foram submetidas a infecção, o percentual de células infectadas após 48h foi de  $3.3 \pm 0.8\%$  e após 72h foi de  $5 \pm 1.4\%$  (Fig. 4.22 A-C). Interessante, que estes valores foram menores do que os obtidos pela infecção de células coriônicas CK-7+.

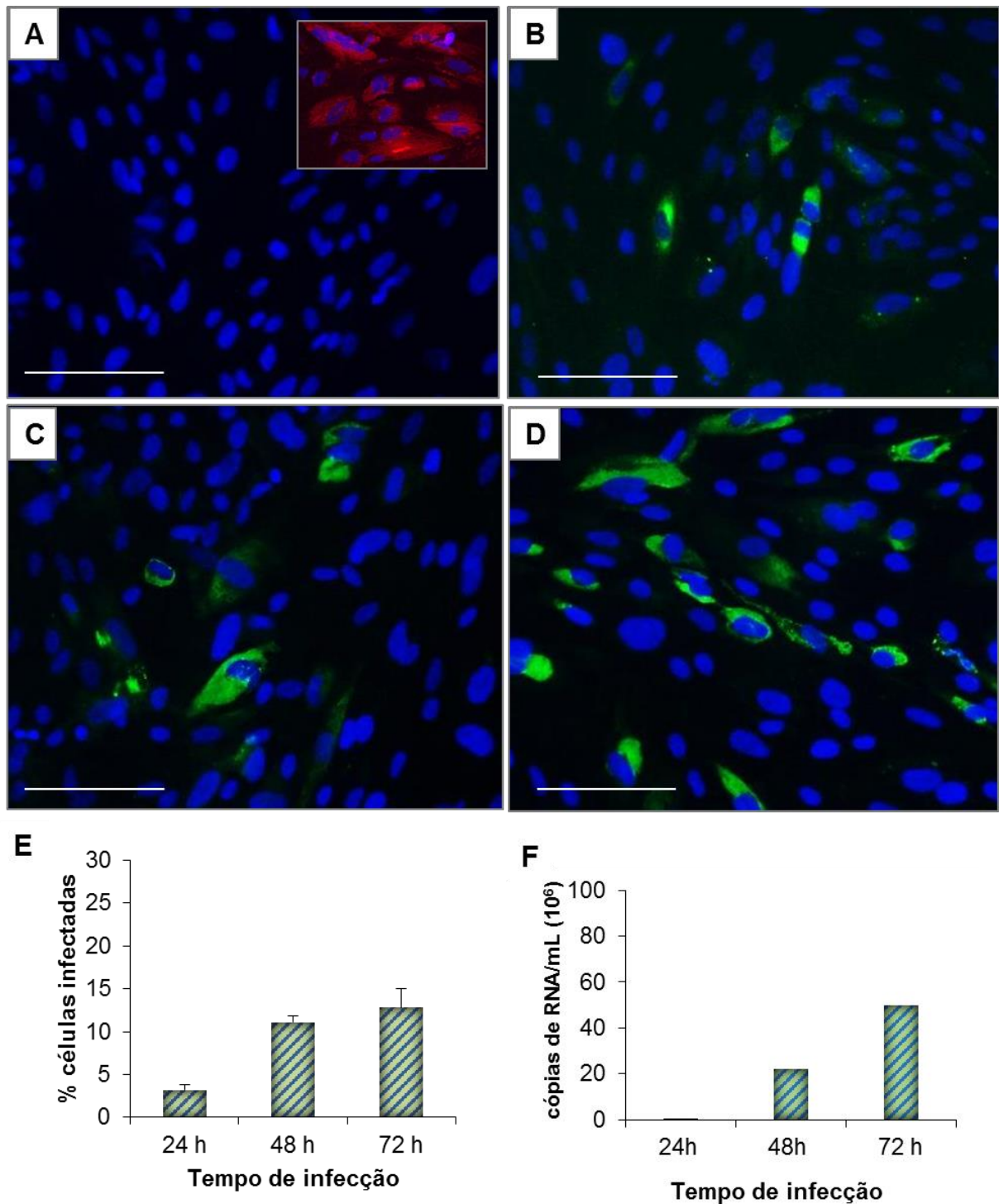


Figura 4.21: **Cinética de infecção de células primárias coriônicas frente à baixa carga viral:** células CK-7+ foram Mock (A) ou infectadas por ZIKV (B-E) com a multiplicidade de infecção (MOI) 1 por (B) 24h, (C) 48h e (D) 72h. É possível observar a marcação da proteína viral em verde (anticorpo primário 4G2 e secundário AlexaFluor 488) e em azul a marcação do núcleo celular (DAPI). (E) O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão do percentual de células infectadas durante a cinética de infecção, n=5. (F) O gráfico representa o número de cópias de RNA viral/mL de 1 ensaio experimental. Barra=50  $\mu$ M.



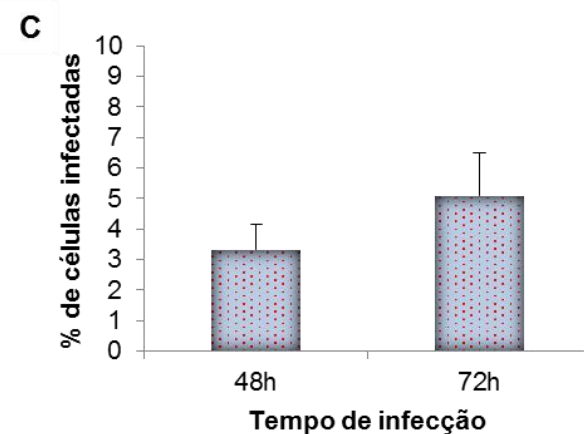
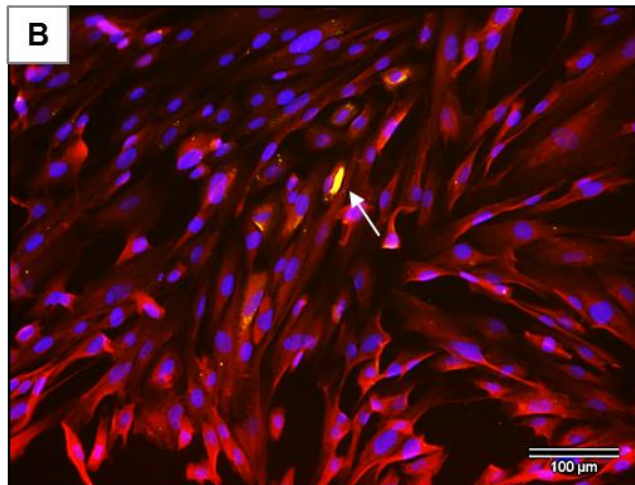
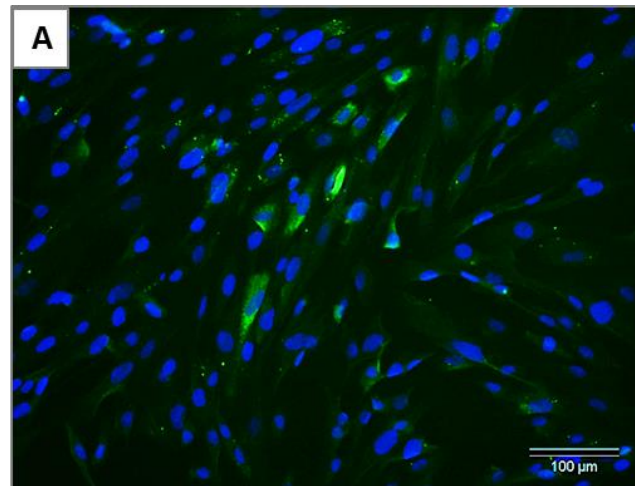


Figura 4.22: **Deteccção do antígeno viral junto a caracterização fenotípica por vimentina de células primárias coriônicas:** as células foram infectadas por ZIKV com a multiplicidade de infecção (MOI) 1 por 48h e 72h. **(A)** dupla marcação do antígeno viral em verde pelo anticorpo 4G2 e DAPI em azul e **(B)** imunofenotipagem com o marcador vimentina em vermelho na tripla marcação com o 4G2 e DAPI. É possível observar em laranja a colocalização de células ZIKV+ e vimentina+ **(B, seta)**. **(C)** O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão do percentual de células infectadas durante a cinética de infecção.

Já que a infecção de células coriônicas com MOI 1 foi baixa, foram conduzidos ensaios com MOI 20 para avaliar se este resultado de menor permissividade seria alterado frente a alta carga viral (Fig. 4.23). De fato, aumentando a carga viral os percentuais de infecção foram altíssimos no decorrer da cinética,  $21 \pm 0.3\%$ ,  $56.5 \pm 5.4\%$  e  $80.8 \pm 3\%$  após 24h, 48h e 72h, respectivamente (Fig. 4. 23B-F). Em maior aumento, destaque para o perfil de marcação do antígeno viral perinuclear, sugerindo intensa replicação viral no retículo endoplasmático (Fig. 4.23E, asterisco).

Analisando a susceptibilidade e o perfil de infecção pelo vírus Zika dos diferentes tipos celulares, em resumo observamos que frente a baixa carga viral houve diferença estatística entre todos os tipos analisados ( $p \leq 0,0008$ ), as células amnióticas foram mais susceptíveis seguidas de corion CK-7+ e vimentina+ (Fig. 4.24A). Porém, frente a altas cargas virais (MOI 10 e 20) as células coriônicas vimentina+ exibiram altos percentuais de infecção tempo-dependente, sem diferença estatística (Fig. 4.24B). No entanto, comparando células coriônicas vimentina+ com CK-7+ infectadas com MOI 20, observamos uma diferença estatística ( $p=0,0008$ ) entre os percentuais de infecção,  $56 \pm 5\%$  de células vimentina+ e  $77 \pm 11\%$  de CK-7+ apresentaram marcação do antígeno viral (Fig. 4.24C) O conjunto dos resultados obtidos com células da membrana fetal sugere que células CK-7+ são mais susceptíveis a infecção por ZIKV.

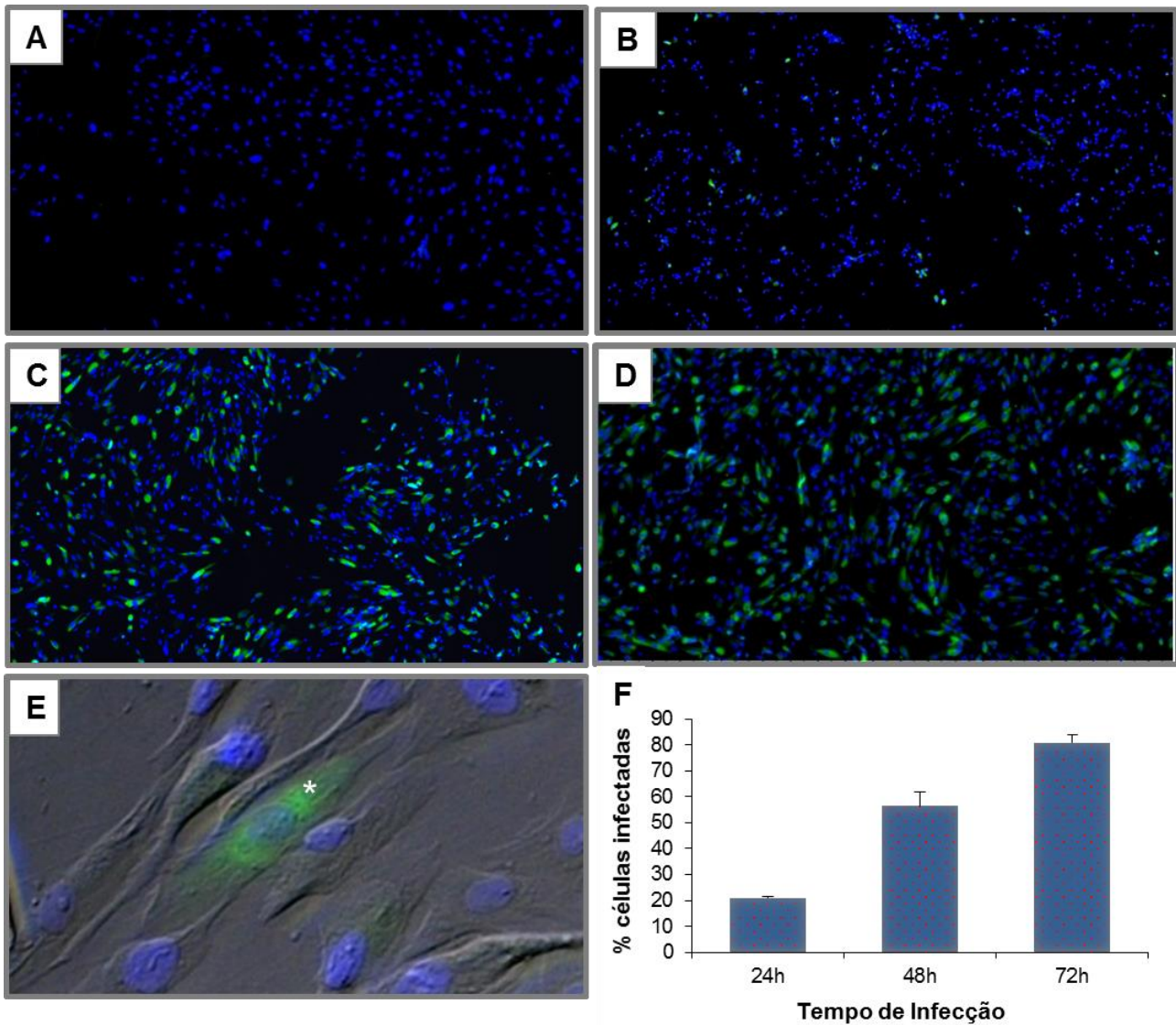


Figura 4.23: **Cinética de infecção de células primárias coriônicas frente à alta carga viral:** células vimentina+ foram: (A) Mock ou infectadas por ZIKV com a multiplicidade de infecção (MOI) 20 por (B) 24h, (C) 48h e (D) 72h. É possível observar a marcação da proteína viral em verde (anticorpo primário 4G2 e secundário AlexaFluor 488) e em azul a marcação do núcleo celular (DAPI). (E) em maior aumento para evidenciar a marcação viral (asterisco), característica de replicação de flavivirus no retículo endoplasmático na região perinuclear. (F) o gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão do percentual de células infectadas durante a cinética de infecção. N=5.

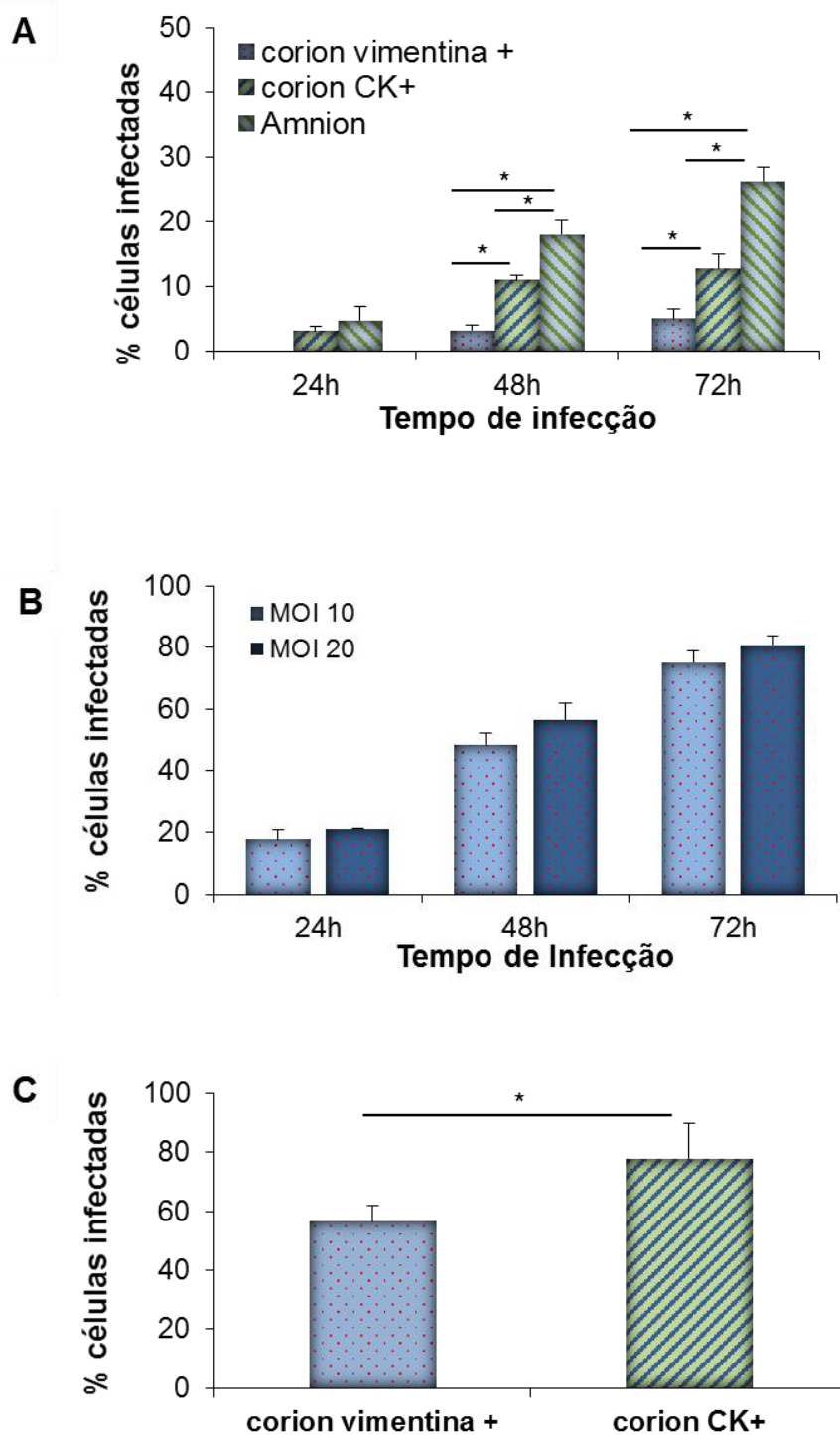


Figura 4.24: Análise da susceptibilidade e do perfil de infecção pelo vírus Zika: (A) células corion vimentina+, corion CK-7+ e amnion foram infectadas com a multiplicidade de infecção (MOI) 1 e (B) corion vimentina + com MOI 10 e 20 durante uma cinética de infecção (24h-72h). (C) corion vimentina + e CK-7+ foram infectadas com MOI 20 por 48h. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão do percentual de células infectadas. N=5 e \* $p \leq 0,0008$ . ANOVA fator único.

#### 4.5.2. Detecção da Partícula Viral por MET

Os resultados de ultraestrutura de células coriônicas não infectadas (Fig. 4.25-4.30) demonstraram predominância de células com morfologia fibroblastóide, de núcleo e citoplasma alongados (Fig. 4.25A-E), assim como observado por microscopia de fluorescência de células vimentina+ (Fig. 4.25F). Por ultraestrutura foi observado poucas células de morfologia poligonal e núcleo redondo (Fig. 4.26A-C), assim como observado por microscopia de fluorescência de células CK-7+ (Fig. 4.26D, *inset*). As células vimentina+ predominantes na cultura apresentaram organização e preservação de organelas como, núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndrias (Fig. 4.27) e complexo de Golgi (Fig. 4.28). Interessante, essas células exibem *stress fibers* (ST), estruturas localizadas abaixo da membrana, formadas por filamentos de actina que auxiliam na adesão e migração celular (Svitkina, 2018) (Fig. 4.29, seta), além de diversas vesículas membranares (Fig. 4.30), semelhantes a caveolina (Fig. 4.30A e B) e vesículas endocíticas (Fig. 4.30B-E, cabeça de seta).

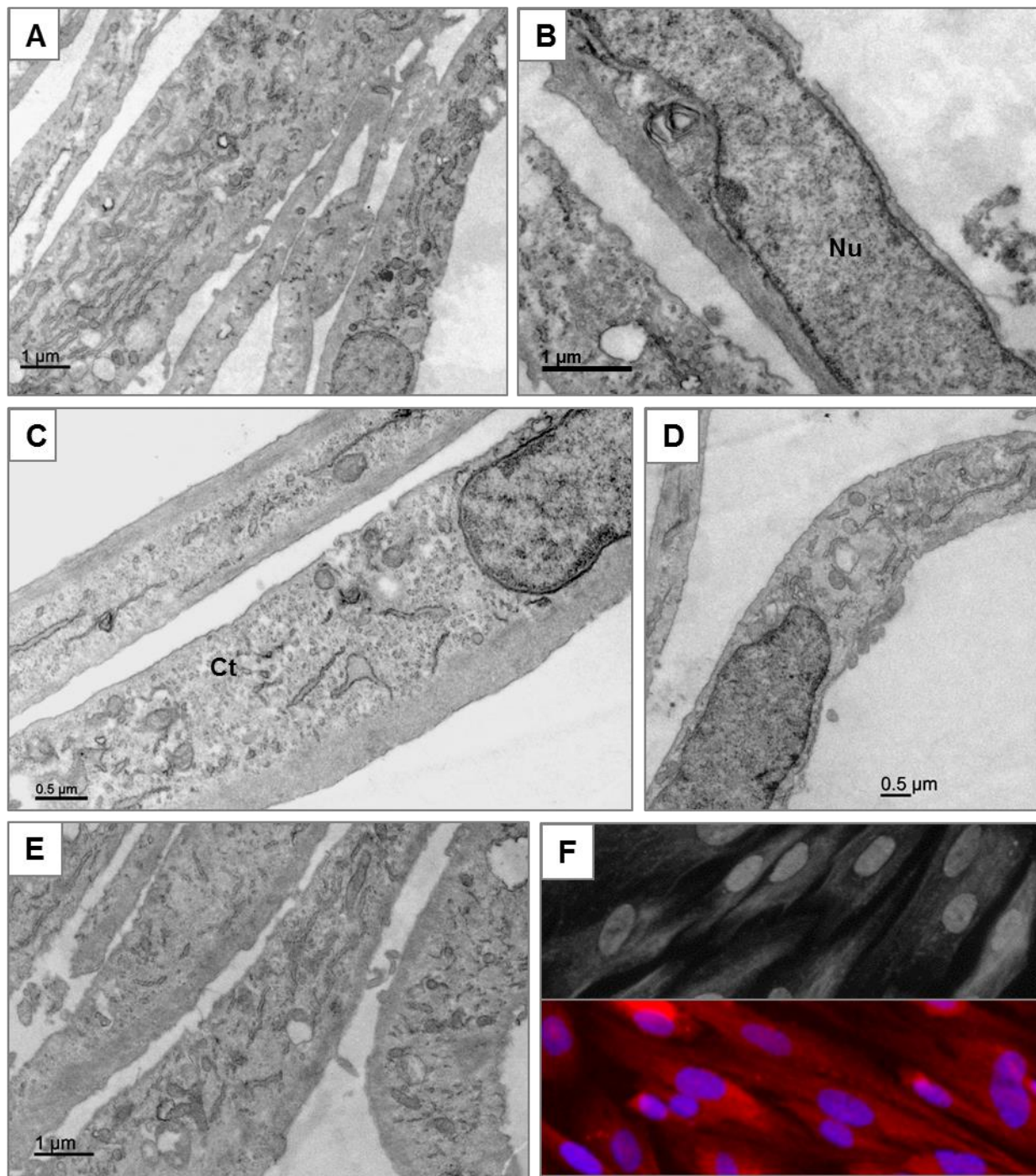


Figura 4.25: Ultraestrutura de células coriônicas vimentina+ por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): cultura Mock apresentando citoplasma (Ct) e núcleo (Nu) alongados (A-E). Por microscopia de fluorescência se observa uma cultura mista com predominância de células primárias coriônicas vimentina+ (F), com morfologia fibroblastóide semelhante ao observado por MET.

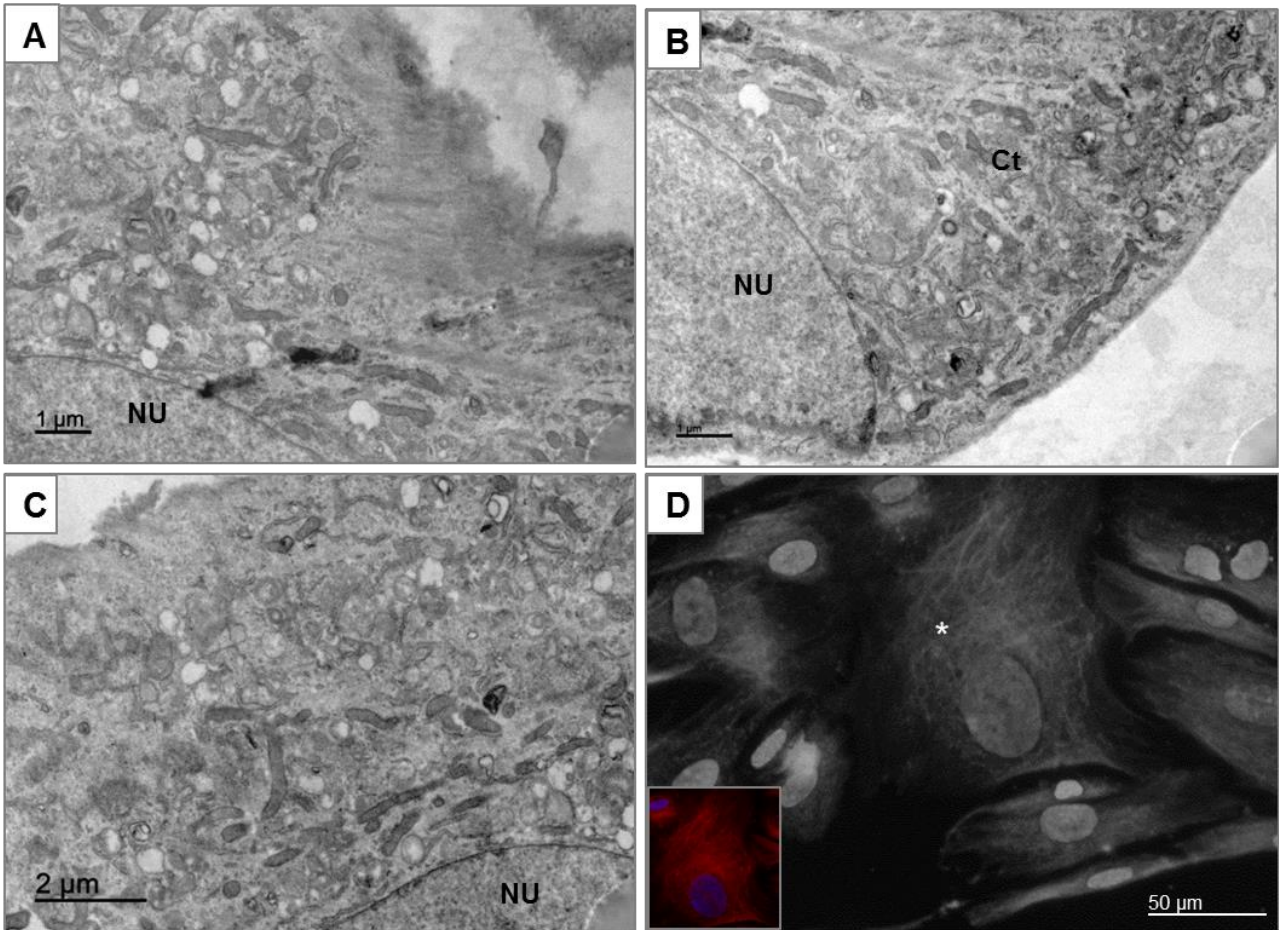


Figura 4.26: Ultraestrutura de células coriônicas CK-7+ por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): cultura Mock apresentando citoplasma volumoso (Ct) e núcleo arredondado (Nu) (A-C). Por microscopia de fluorescência se observa uma cultura mista com a presença de poucas células primárias coriônicas CK-7+ (D), com morfologia semelhante ao observado por MET.

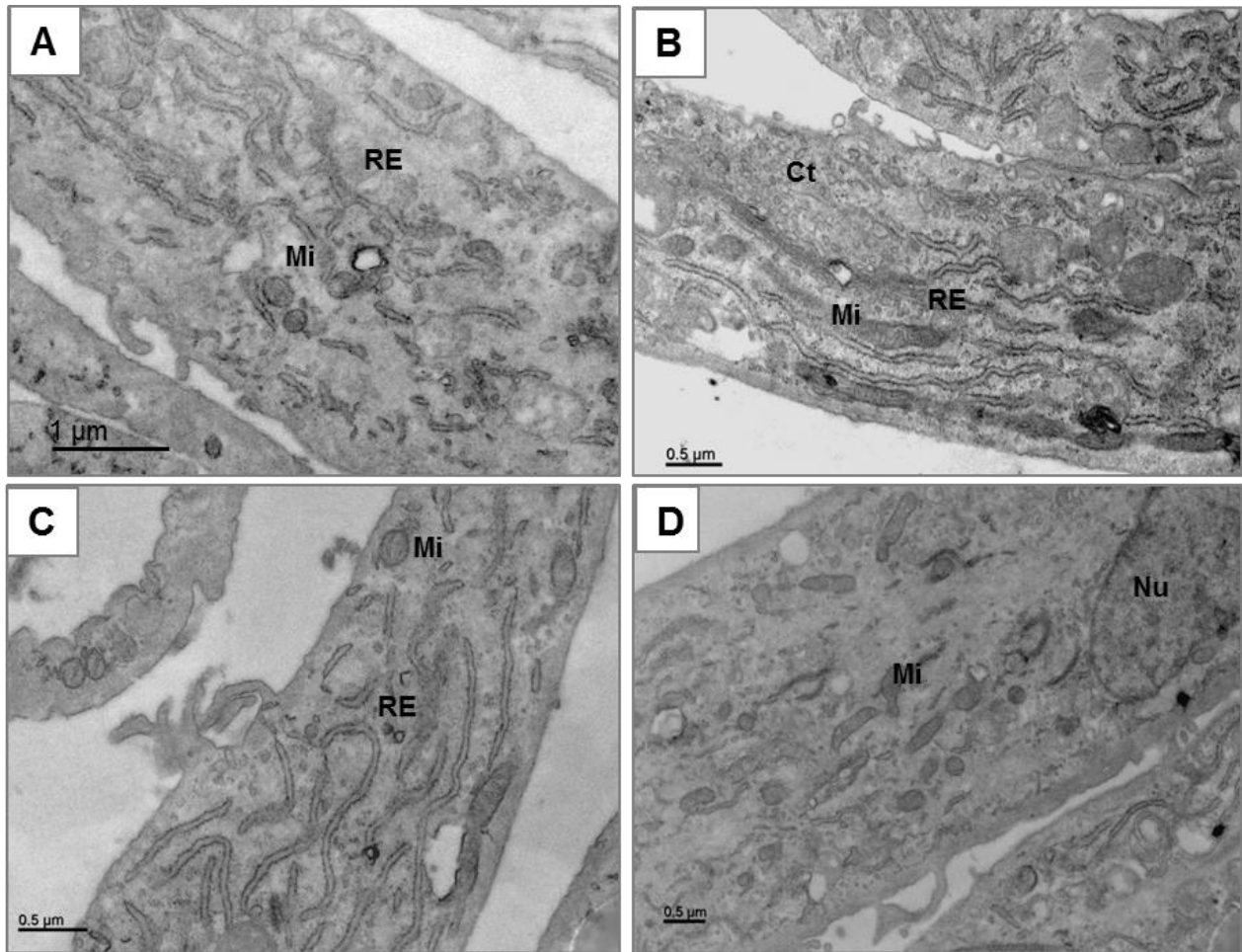


Figura 4.27: Ultraestrutura das organelas citoplasmáticas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): (A-D) cultura Mock apresentando citoplasma (Ct) e núcleo (Nu) alongados, retículo endoplasmática (RE) bem distribuído e organizado estruturalmente com mitocôndrias preservadas (Mi).



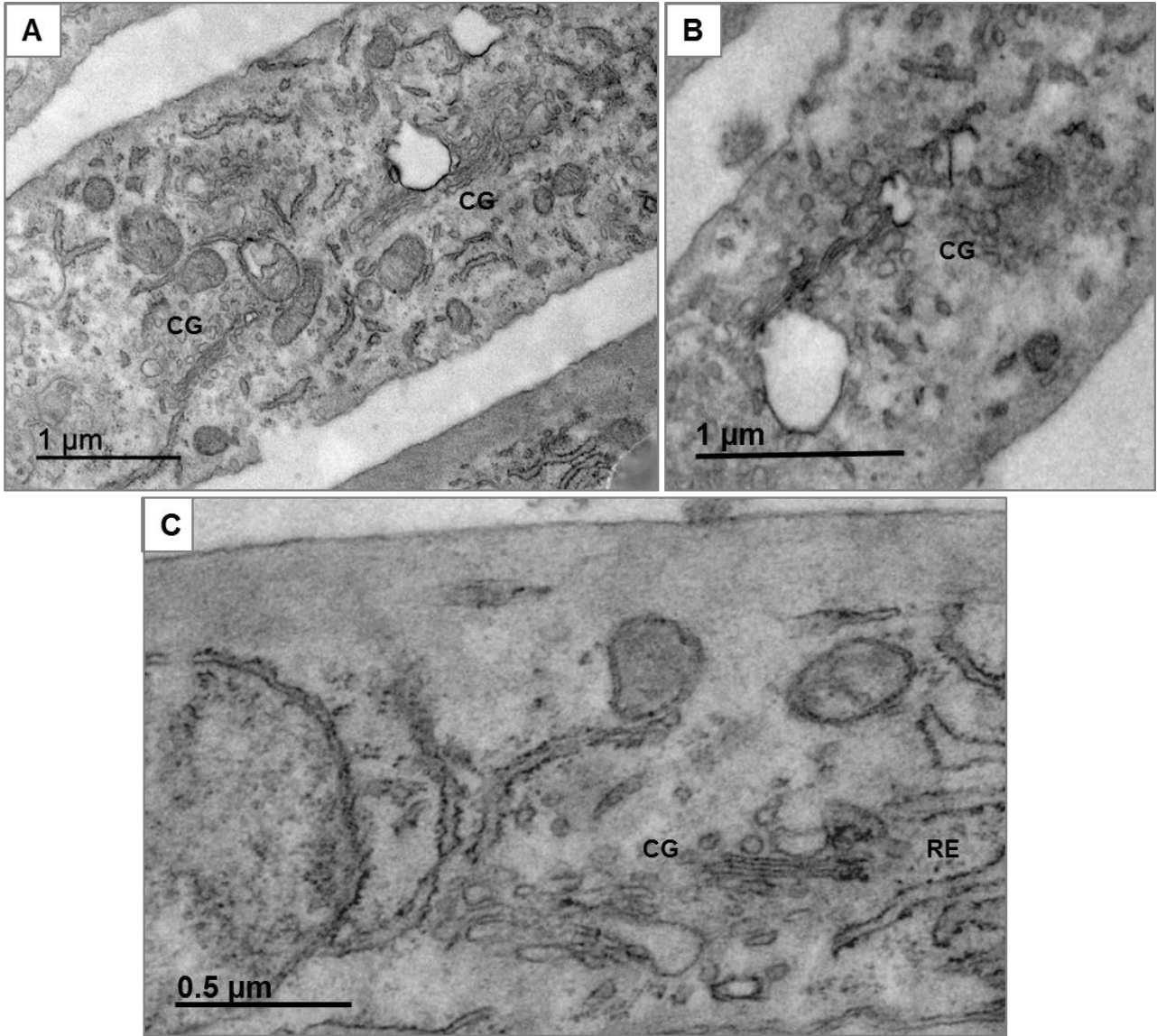


Figura 4.28: Ultraestrutura do complexo de Golgi por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): (A-C) cultura Mock apresentando o complexo de Golgi (CG) estruturalmente organizado e preservado.

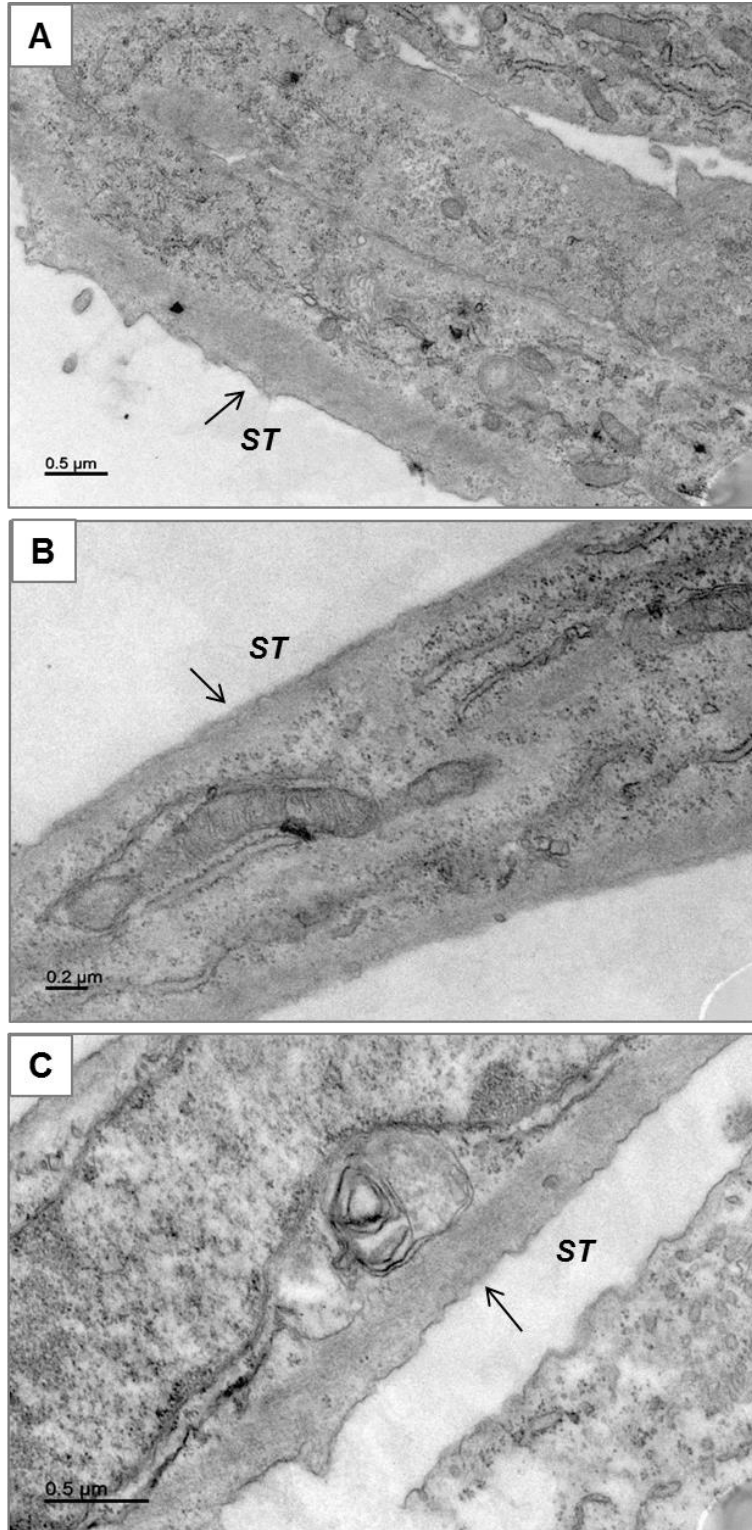


Figura 4.29: Ultraestrutura *stress fibers* por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): (A-C) cultura Mock com destaque para as estruturas *stress fibers* (ST, seta) formadas por filamentos de actina para adesão ao substrato.

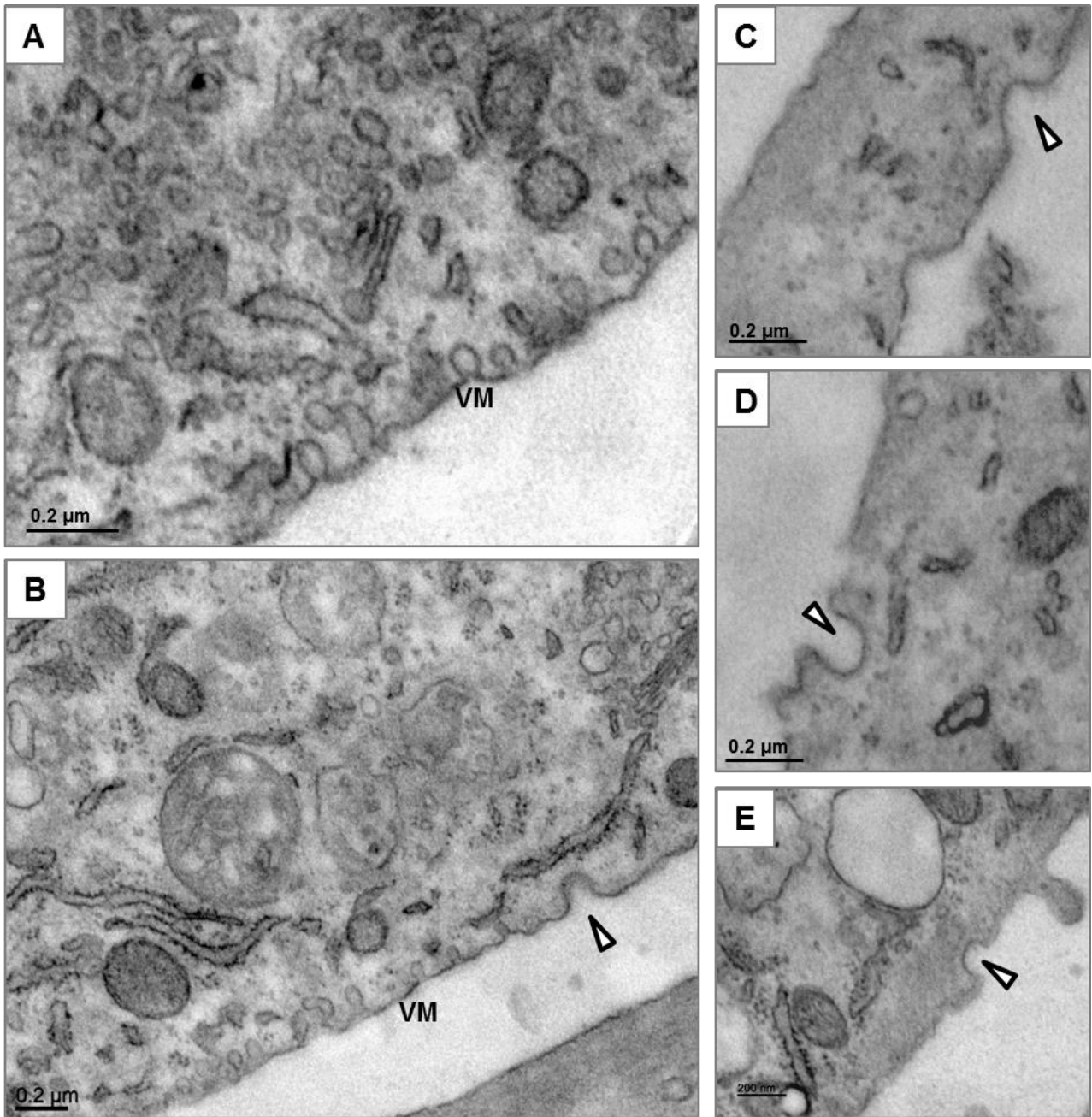


Figura 4.30: Ultraestrutura vesículas membranares por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): (A-E) cultura Mock-infectada com destaque para inúmeras vesículas membranares (VM), algumas apresentando estruturas semelhantes a fossas endocíticas (cabeça de seta).

A infecção das culturas de células coriônicas (Fig. 4.31-4.33) induziu importantes alterações ultraestruturais como: ruptura das estruturas *stress fibers* (Fig. 4.31A, seta), extrema desorganização e alargamento do retículo endoplasmático, aparecimento de estruturas sugestivas de vacuolos autofágicos (Fig. 4.32A e B, #), inúmeras vesículas membranares (Fig. 4.32A, VM), estruturas de membrana lisa (Fig. 4.33A e B), apesar da preservação das mitocôndrias (Fig. 4.31-4.33, asterisco). Além disso, foi possível observar partículas virais em vesículas no retículo endoplasmático (Fig. 4.33A e B, seta). Essas partículas foram medidas de acordo com as barras das figuras, onde foi confirmado o diâmetro entre 40 e 60nm.

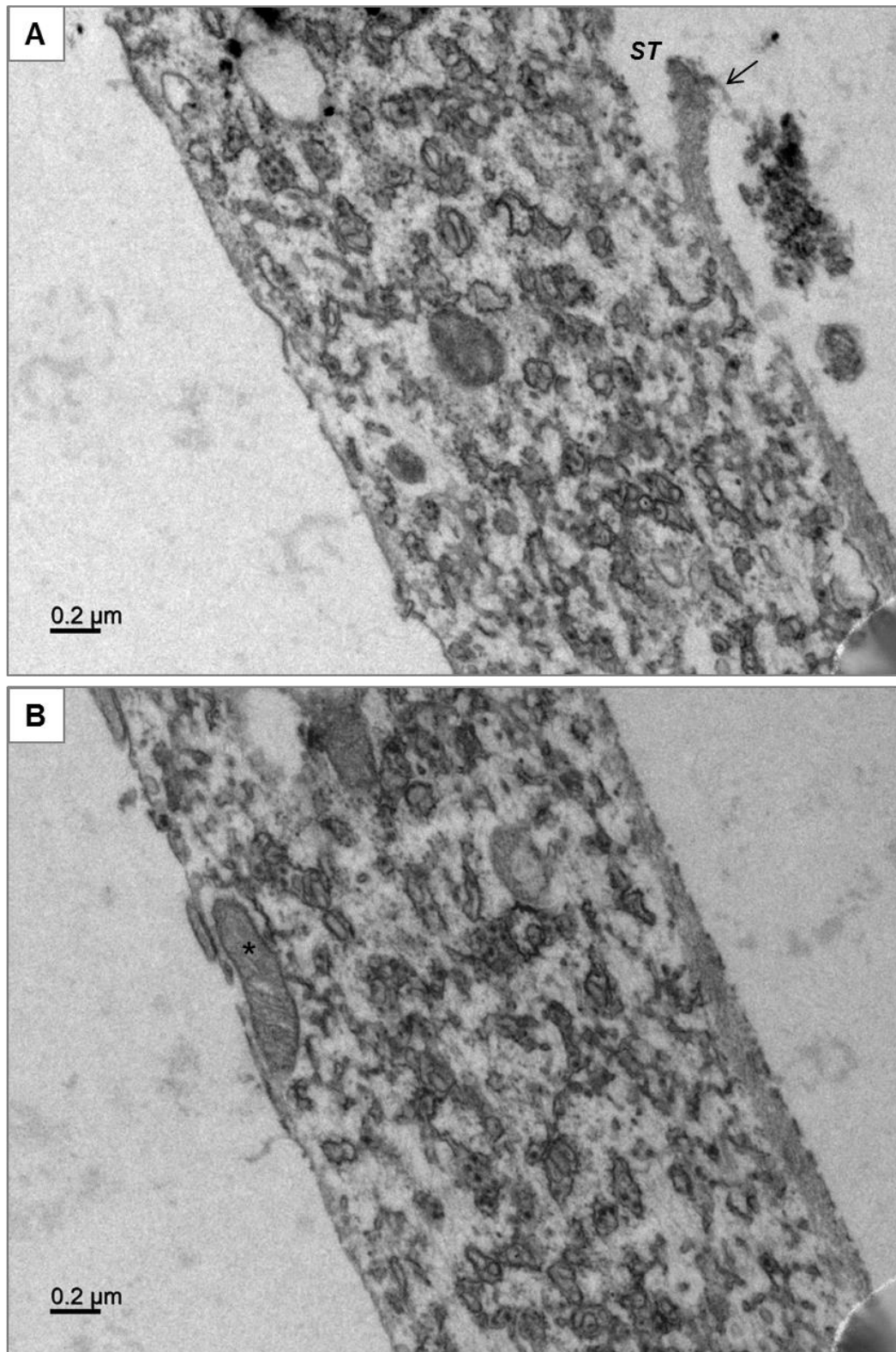


Figura 4.31: Ultraestrutura de células coriônicas infectadas por ZIKV e analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão: é possível observar intensa desestruturação das organelas celulares, incluindo ruptura de estruturas *stress fibers* (A, ST seta). Importante observar mitocôndrias preservadas (asterisco).

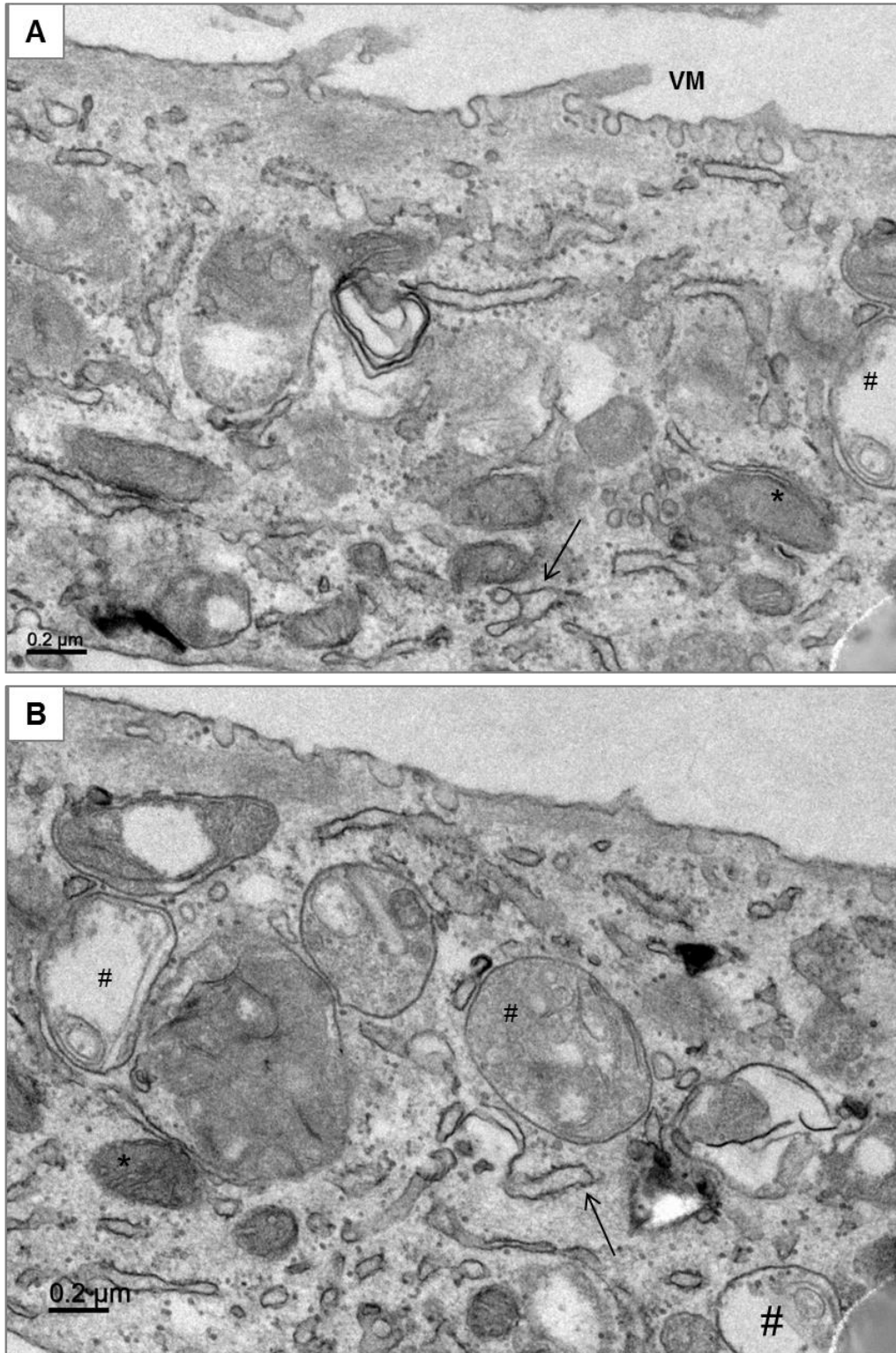


Figura 4.32: Detalhamento da desorganização ultraestrutural de células coriônicas infectadas por ZIKV e analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão: interessante observar intensa desorganização especialmente do retículo endoplasmático com alargamento das cisternas (seta), surgimento de estruturas sugestivas de autofagossoma (#), mitocôndrias preservadas (\*) e vesículas membranares (VM).

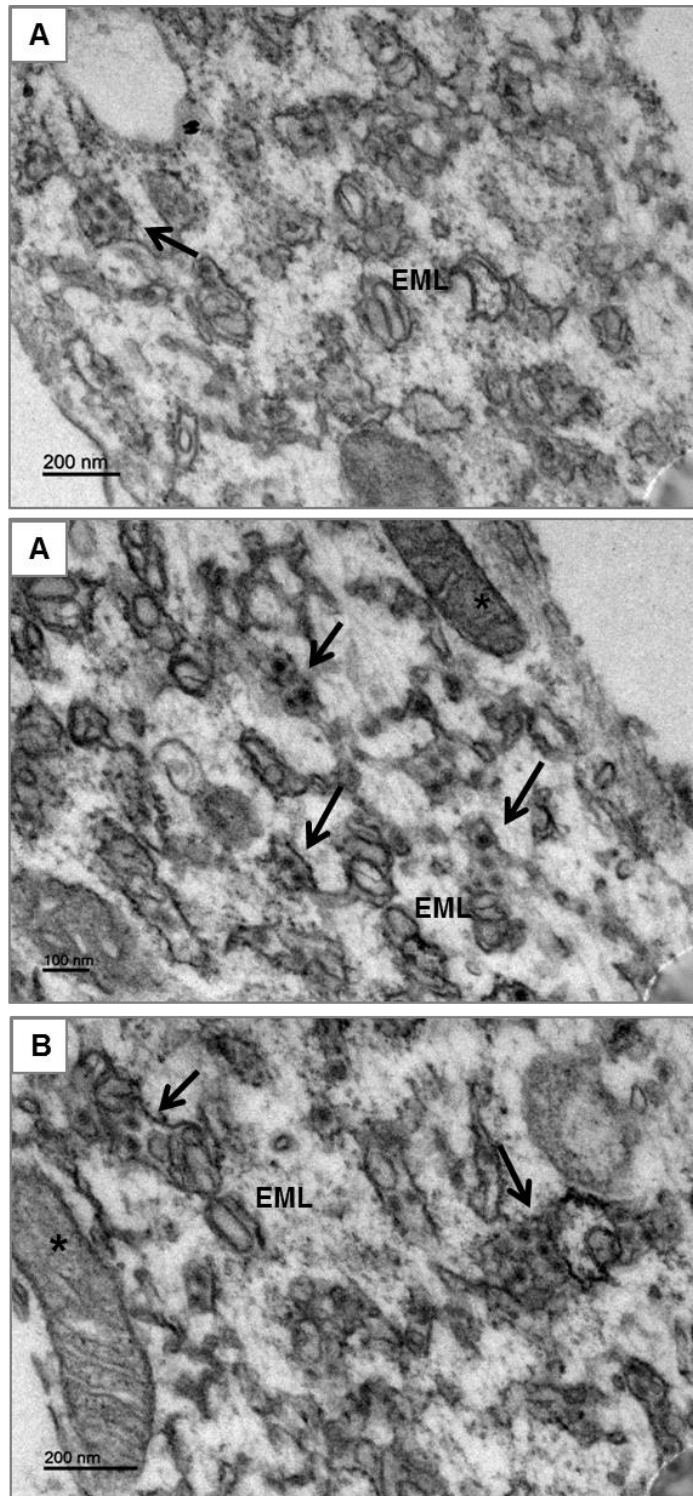


Figura 4.33: Presença da Partícula viral em células coriônicas infectadas por ZIKV e analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão: possível observar partículas virais com diâmetro entre 40 e 60nm no interior de vesículas no retículo endoplasmático (seta), estruturas de membrana lisa vesicular e tubular (EML) utilizadas para replicação viral e Mí bem preservadas (asterisco).

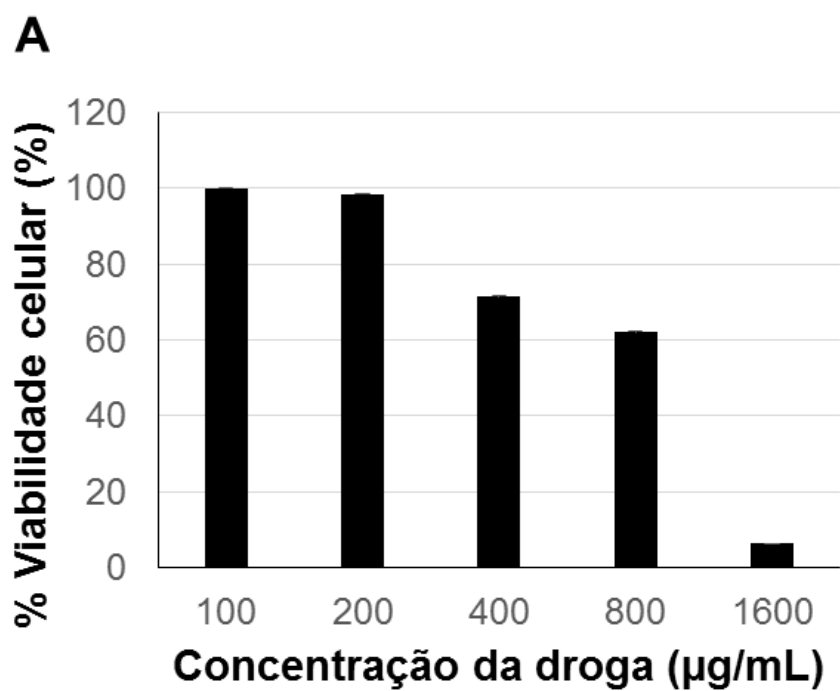
## 4.6. Avaliação do Efeito Antiviral do Nitaxozanida em Culturas Primárias de Células Coriônicas e Explantes da Membrana Fetal

### 4.6.1 Redução de células infectadas por detecção de antígeno viral

Foi avaliada a atividade antiviral do fármaco Annita® sobre cultura de células coriônicas CK-7+. Iniciamos os ensaios experimentais avaliando a citotoxicidade do fármaco pelo ensaio MTT garantindo a exclusão de efeitos tóxicos para a célula hospedeira. O resultado do tratamento das culturas com as concentrações de 100 - 1600 µg/mL por 48h demonstrou perda da viabilidade celular dose-dependente (Fig.4.34A). O cálculo de LC<sub>50</sub> foi de 1055±124 µg/mL (Fig.4.34B), sendo assim os ensaios foram conduzidos até a dose de 100 µg/mL, cerca de 10 vezes menor que o LC<sub>50</sub>.

Culturas de células coriônicas foram infectadas com a alta carga viral de MOI 20, para avaliar o efeito restringente do fármaco, e tratadas com as concentrações de 0-100 µg/mL de Annita® por 48 horas. Atraves da detecção do antígeno viral por imunofluorescência, avaliamos o percentual de redução da infecção viral das culturas (Fig. 4.35A-E), foi observada uma atividade antiviral dose-dependente (Fig. 4.35B-E). É importante observar não só a redução do número de células infectadas, mas também a redução da intensidade de fluorescência frente ao tratamento nas concentrações de 12 µg/ml (Fig. 4.35B), 25 µg/ml (Fig. 4.35C) e 50 µg/ml (Fig. 4.35D) comparados a cultura não tratada (Fig. 4.35A). A concentração máxima utilizada de 50 µg/mL de Annita® levou a uma redução de 79.1±5,3% da infecção (Fig. 4.35D e F). O valor alcançado de EC<sub>50</sub> foi 23±5,3 com isto foi obtido um excelente índice de seletividade (do inglês *selectivity index* (SI)), que mede quanto o fármaco é seletivo ao patógeno em relação a célula hospedeira, com valor de 46 (Fig. 4.34B).





**B**

Parâmetros	Corion
*LC <sub>50</sub>	1083±124
**EC <sub>50</sub>	23±5,3
***IS	46

\*Lethal concentration \*\* Effective concentration \*\*\* índice de seletividade

Figura 4.34: **Efeito citotóxico do fármaco Nitazoxanida em células primárias coriônicas:** (A) as células CK-7+ foram tratadas por 48h com as concentrações de 100 - 1600 µg/mL do fármaco para cálculo do LC<sub>50</sub>. (B) tabela como os valores de LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> e índice de seletividade (IS). N=3.

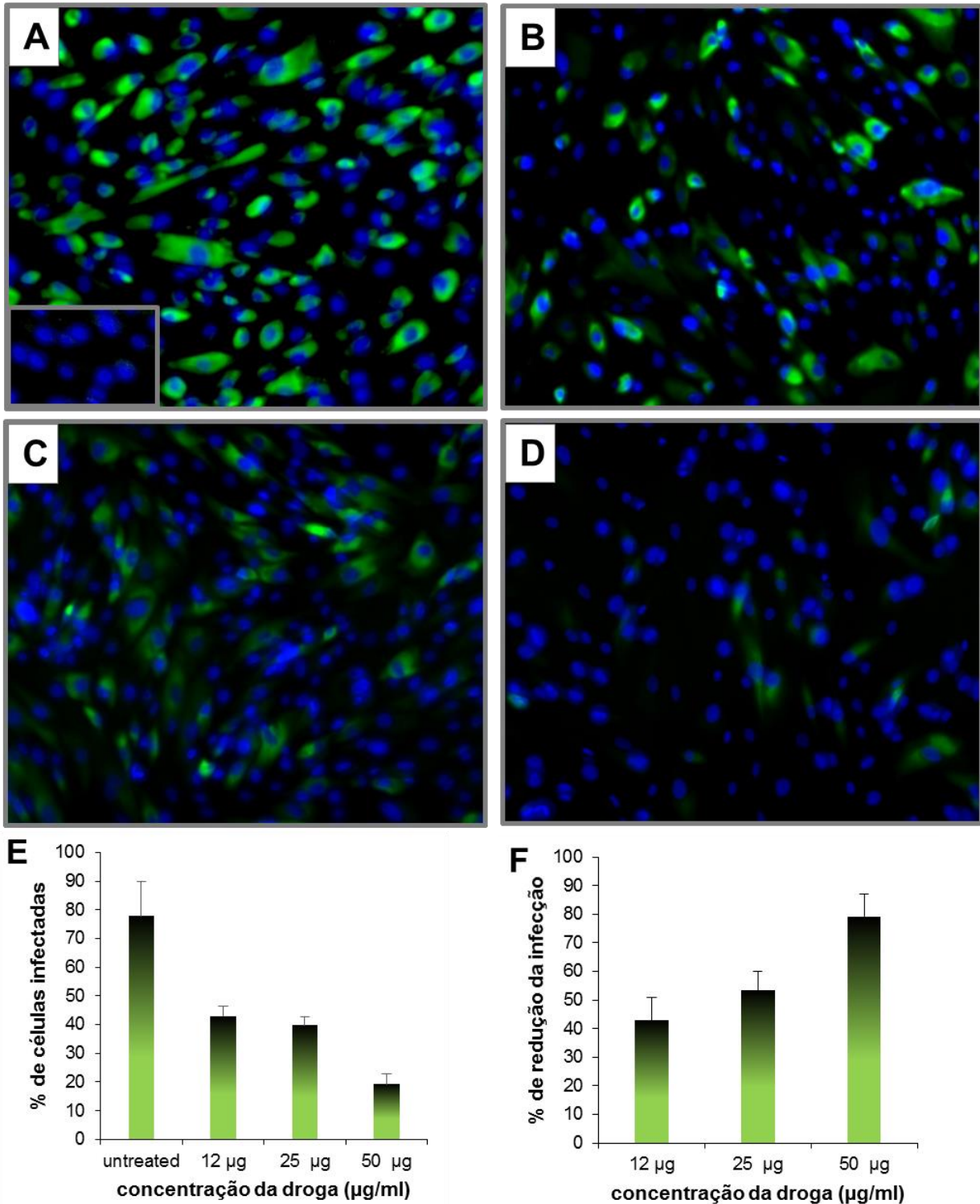


Figura 4.35: Efeito antiviral do fármaco nitazoxanida em células primárias coriônicas: as células com CK-7+ foram (A, inset) Mock ou (A-D) infectadas por ZIKV com a multiplicidade de infecção (MOI) 20. A detecção do antígeno viral foi realizada através do ensaio de imunofluorescência. Após o período de adsorção as culturas foram lavadas e tratadas (B-D) por 48h com (B) 12, (C) 25 e (D) 50 µg/mL da droga. (E) o gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão do percentual de células infectadas. (F) o gráfico demonstra o efeito antiviral dose-dependente evidenciado pelo percentual de redução de células infectadas. N=3.

#### 4.6.2. Redução de efeito citopático por ensaio de plaque e redução de carga viral por detecção de cópias de RNA viral

Para avaliar a redução do número de partículas virais infecciosas no sobrenadante das culturas tratadas em relação as culturas não tratadas, foi realizado o ensaio de plaque (Fig. 4.36A). Esta análise revelou que a concentração de 25 µg/mL de Annita® nas células coriônicas inibiu 100% da progênese (Fig. 4.36A). Além disto, utilizando a técnica de RT-qPCR para quantificação do número de cópias de RNA viral/mL no sobrenadante das culturas, a quantificação das culturas não tratadas foi de  $55 \times 10^6$  cópias/mL, enquanto nas culturas tratadas foi de  $3.2 \times 10^6$  cópias/mL o dado demonstra que a concentração 50 µg/mL reduziu em 93% o número de cópias de RNA viral (Fig. 4.36B). Interessante observar que o ensaio de Plaque considerada a técnica ouro da virologia, pois revela a presença somente de partículas virais infecciosas, e não somente RNA viral, já demonstrou a inibição da progênese na concentração de 25 µg/mL (Fig. 4.36B), revelando a excelente atividade da droga sobre o vírus.

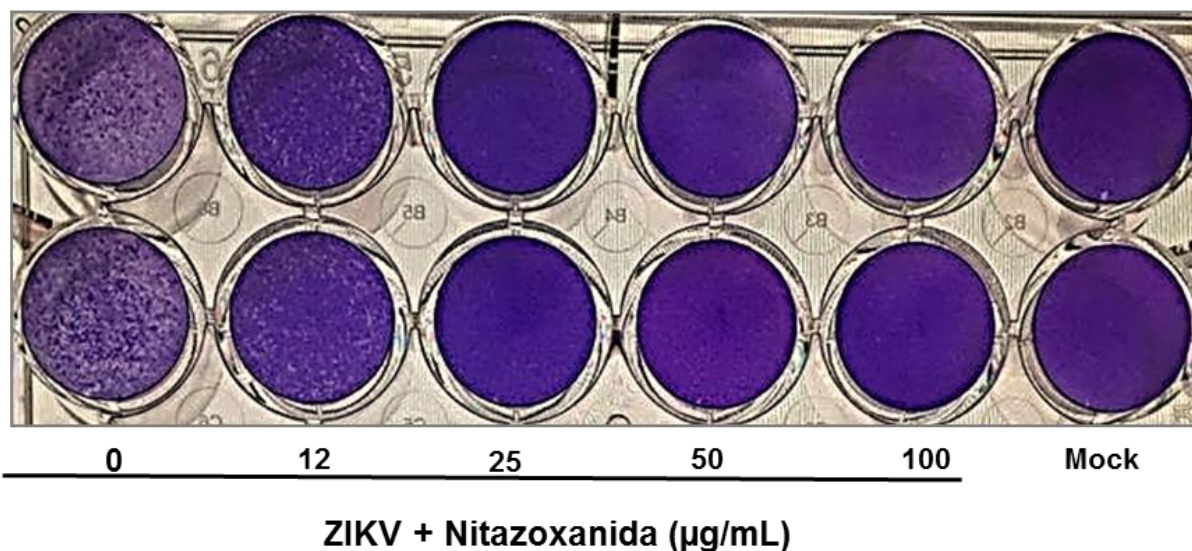
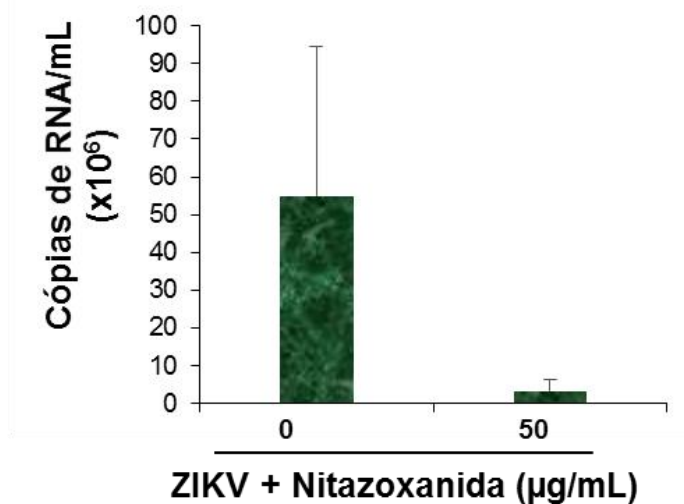
**A****B**

Figura 4.36: Avaliação do efeito antiviral do fármaco Nitazoxanida em células primárias coriônicas por ensaio de Plaque e RT-qPCR: as células CK+ foram Mock ou infectadas por ZIKV com a multiplicidade de infecção (MOI) 20. Após o período de 2 de adsorção as culturas foram lavadas e tratadas com 12, 25, 50 e 100 µg/mL da droga. Após 48h de infecção o sobrenadante das culturas foram coletados para a detecção de partículas infecciosas pelo ensaio de Plaque (N=3) e extração de RNA para ensaio de RT-qPCR (N=3).

#### 4.6.3. Avaliação morfológica por H&E dos explantes

Embora ainda que preliminar, também foi testada a atividade do Nitazoxanida em explantes da membrana fetal e a análise realizada foi apenas morfológica por microscopia de luz em cortes corados por H&E (Fig. 4.37). Após separação mecânica, as membranas amnióticas (Fig. 4.37A-C) e coriônicas (Fig. 4.37D-F) foram subdivididas nos seguintes grupos: controle (Fig. 4.37A e D) ou infectadas por ZIKV (Fig. 4.37 B-C e E-F) com  $1 \times 10^6$  PFU/mL. Após o período de adsorção viral as culturas de explantes foram tratadas por 48h com 50  $\mu\text{g/mL}$  da droga (Fig. 4.37C e F). Os resultados revelaram que após infecção a camada de células epiteliais da membrana amniótica foi danificada, como observado pela ausência de citoplasma e núcleo celular (Fig. 4.37B) quando comparada a membrana Mock (Fig. 4.37A). Porém, o tratamento com o fármaco protegeu esta camada celular do efeito citopático provocada pela infecção viral (Fig. 4.37C). Efeito semelhante pode ser observado na membrana coriônica relacionado a uma proteção pelo tratamento (Fig. 4.37F) em relação ao dano tecidual induzido pela infecção (Fig. 4.37E).

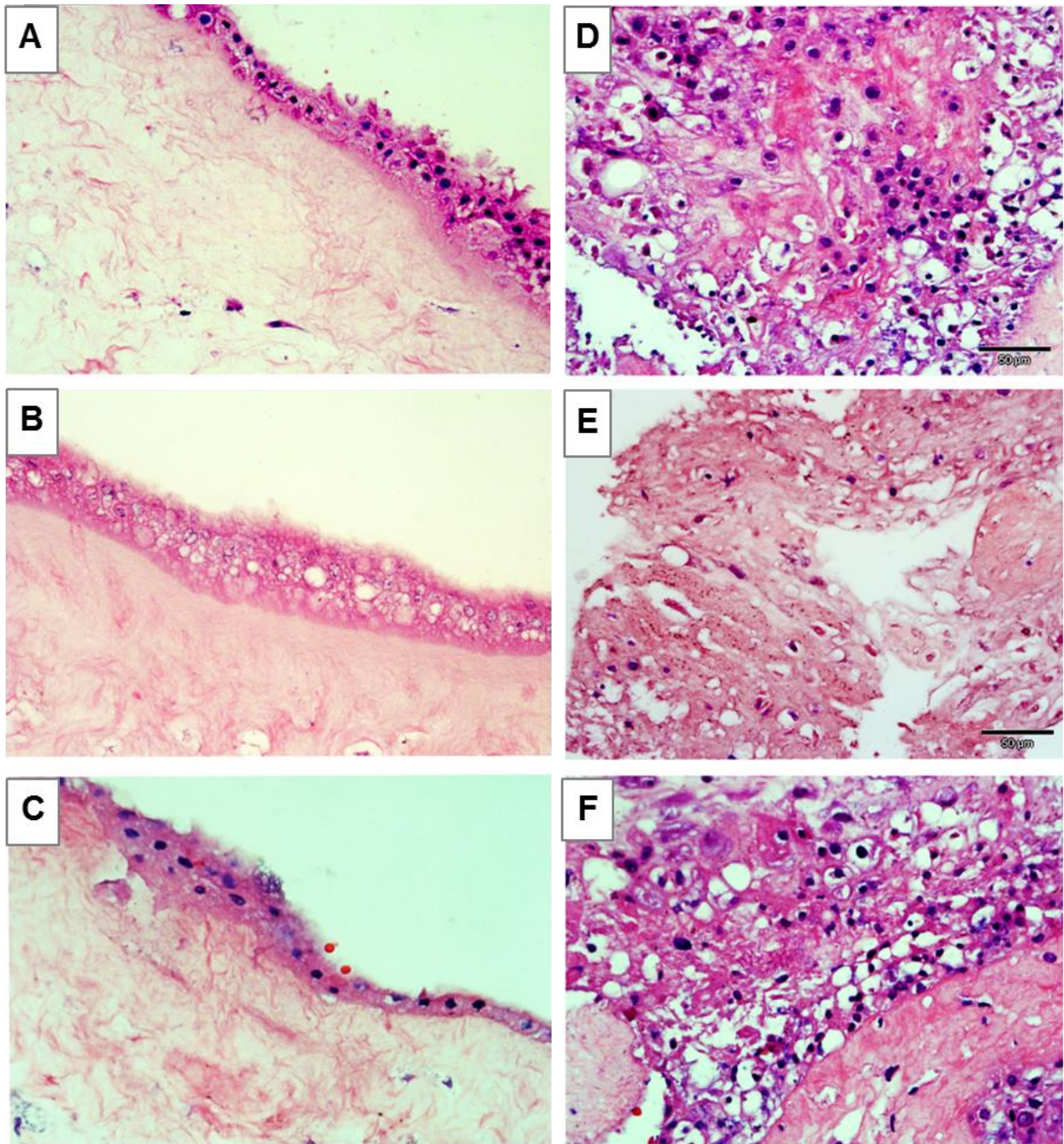


Figura 4.37: Efeito antiviral do fármaco Nitazoxanida em explantes da membrana fetal: após separação mecânica a membrana amniótica (A-C) e coriônica (D-F) foram Mock (A e D) ou infectadas por ZIKV (B – E) com  $1 \times 10^6$  PFU/mL. Após o período de adsorção viral, os explantes foram tratados (C e F) por 48h com  $50 \mu\text{g/mL}$  da droga.

## 5. DISCUSSÃO

O atual estudo teve por objetivo implementar o modelo de cultivo de explantes e células primárias placentárias, órgão de extrema relevância para a transmissão congênita, a fim de investigar a susceptibilidade destas amostras a infecção pelo vírus Zika *in vitro*. Para tanto, de modo geral, foram utilizadas diferentes metodologias de obtenção e cultivo, seguido de caracterização morfológica, fenotípica e ultraestrutural das culturas de placenta humana a termo. Após a confirmação da infectividade dos tecidos e células placentárias pelo ZIKV, o próximo passo foi validar o modelo estabelecido como uma plataforma para teste de moléculas com potencial atividade antiviral na busca por compostos com eficácia em inibir a transmissão congênita do ZIKV. O foco do trabalho foi o reposicionamento do fármaco Nitazoxanida, aprovado pela FDA para administração em gestantes.

Como mencionado, o ZIKV se tornou uma preocupação de saúde pública mundial devido aos surtos ocorridos nas Américas, especialmente no Brasil em 2015-2016. Este fato ganhou relevância e atenção durante o período gestacional devido sua associação com anormalidades neurológicas em fetos/recém-nascidos, como a microcefalia (Desai e cols., 2017). O que justifica os objetivos propostos no estudo, contemplando a interação de células de placenta humana com a cepa circulante no Brasil (BRZIKV\_AB\_ES), os dados obtidos pelo sequenciamento parcial do gene da proteína não estrutural NS1 revelou 100% de identidade nucleotídica da região analisada com a cepa Brasileira pioneira na correlação entre ZIKV e microcefalia, a Brazil-ZIKV2015 (Calvet e cols., 2016), confirmando que os estudos foram conduzidos com uma cepa circulante no Brasil. Apesar de o ZIKV possuir duas linhagens primariamente identificadas: A Africana e a Asiática, estudos filogenéticos demonstraram que a cepa que infectou a população brasileira pertence a linhagem Asiática (Desai e cols., 2017; Calvet e cols., 2016; Bayer e cols., 2016).

A placenta com sua membrana fetal constitui um órgão com estrutura e funções especializadas que desempenham papel crucial na barreira física, fornecendo uma barreira defensiva mecânica, bioquímica e imunológica restringindo o microambiente intrauterino a fatores externos nocivos ao desenvolvimento fetal (Delorme-Axford e Cols., 2013; Timothy e Cols., 2002). Dados da literatura também ressaltam que a integridade da membrana fetal até o final da gestação é vital para o início do trabalho

de parto, sendo uma importante fonte de prostaglandina (Hassan e cols., 2012). Interessante que em nossos estudos realizados com placenta a termo

a separação mecânica da membrana fetal não alterou a organização estrutural dos tecidos, conforme já demonstrada por microscopia ótica em cortes histológicos (Beçak & Paulete, 1976). No entanto, observamos ao longo da padronização das culturas uma grande variabilidade da viabilidade das amostras, alguns autores colocam que estas variações podem estar relacionadas a fatores como: idade gestacional, tipo de parto, tempo de trabalho de parto, condições de transporte da placenta, sangue residual, bem como o tempo entre o parto e o isolamento das células, (Murphy e cols., 2014; Mike e cols., 2010; Gomez Dominguez e cols., 2008). Foi demonstrado que explantes de membrana fetal apresentando múltiplas vacuolizações ao microscópio ótico devem ser descartados, pois as células deste tecido apesar de passivas a digestão enzimática, já estão em processo de morte celular (Motedayyen e cols., 2017). A opção de incluir este tecido em nossas avaliações é devido a intensa vascularização rica em sangue materno da membrana fetal coriônica que mantém estreito contato com a membrana fetal amniótica, apesar de esta ser avascular (Rocha & Baptista, 2015). Além disso, o interesse na membrana coriônica veio da escassez de informações sobre suas características morfológica, bioquímica e funcional, ao contrário do amnion que apresenta diversos dados na literatura, em grande parte pelo interesse em sua característica mesenquimal pluripotente (Yang, e cols., 2018). No entanto, como a troca hematogênica ocorre nas vilosidades coriônicas, foi de fundamental importância estudar aspectos da infecção transplacentária neste tecido. Os explantes cultivados, do mesmo modo apresentaram integridade tecidual. Nas vilosidades as células epiteliais trofoblásticas, tem o sinciciotrofoblasto como células funcionais multinucleadas que limitam o contato do sangue materno com o interior das vilosidades (Gargioni, 2014). As secções dos tecidos também foram submetidas a caracterização fenotípica, evidenciando células epiteliais na membrana e vilosidade coriônicas, conforme demonstrado em diversos estudos pela marcação de citoqueratinas (Ribeiro e cols., 2018; Mamede, 2017; Takako e cols., 2016).

Uma vez estabelecido o modelo de explantes, foi realizada a padronização da dissociação das células primárias da membrana fetal amniótica e coriônica, separadamente e das células da vilosidade coriônica. Embora já tenham sido estabelecidos na literatura diversos protocolos de dissociação dessas células, a



maioria deles não foi reprodutível ou levou a uma variação muito grande quanto a pureza das células epiteliais (Clabault e cols., 2018; Gramignoli e cols., 2016; Murphy e cols., 2014; kliman e cols., 1986). Dentre os protocolos já estabelecidos para isolamento das células amnióticas nota-se uma variação de rendimento entre  $8 \times 10^6$  a  $120 \times 10^6$  de células com viabilidade entre 83 a 98% (Motedayyen e cols., 2017; Miki e cols., 2010; Toda e cols., 2007), o que corrobora com os dados obtidos destacando que células amnióticas foram mais resistentes ao processo de digestão enzimática comparado as células coriônicas, já em relação a variação de rendimento esses dados estão relacionados tanto ao tipo de solução enzimática utilizada quanto a viabilidade da amostra (Murphy e cols., 2014; Mike e cols., 2010; Gomez Dominguez e cols., 2008). Porém, além desses parâmetros, nosso protocolo de escolha rendeu 100% de homogeneidade de células amnióticas CK-7+, de acordo com o desejado e descrito na literatura (Tabatabaei e cols., 2014). Por outro lado, o isolamento de células da membrana coriônica revelou uma cultura mista entre as diferentes placentas utilizadas, sugerindo que de acordo com o rendimento de células epiteliais ocorre ou não sua predominância ao longo o cultivo. Apesar desses dados não invalidar o uso da cultura mista, pois é a que mais se aproximaria do microambiente tecidual, será necessário estabelecer um protocolo que permita maior controle do tipo celular obtido. Da mesma forma, aplicando o protocolo de Kolokoltsova e colaboradores (2017) nos explantes das vilosidades coriônicas foi obtida a formação de esferóides e migração de células apresentando diferentes morfologias, porém será necessário realizar a fenotipagem destas células antes do processo de tripsinização para uma melhor caracterização, uma vez que quando fenotipadas após replaqueamento não foi observado a presença de células epiteliais como esperado para uma cultura mista (Kolokoltsova e cols., 2017).

Além disso, as diferentes morfologias observadas sugerem a presença de células mesenquimais e/ou macrófagos, daí a necessidade de melhor caracterização incluindo marcadores como: CD90, CD105, CD73, CD31, CD68, HLA-DR e HLA-DQ (Yang e cols., 2018; Motedayyen e cols., 2017; Tabatabaei e cols., 2014).

O estudo do papel da placenta na patologia da infecção por ZIKV pode identificar fatores que influenciam sua virulência durante a gestação e contribuir para o conhecimento de como ocorre o rompimento da barreira placentária levando ao impacto secundário no desenvolvimento fetal (Sadovsky e cols., 2016). Apesar de vários estudos terem mostrado a presença do vírus Zika na placenta humana de mãe

acometida pela infecção, sustentando a hipótese de que o ZIKV rompe a barreira placentária e alcança o feto, a patogênese viral neste tecido permanece pouco elucidada (Sheridan e cols., 2017; Martines e cols., 2016; Malkar e cols., 2016). Dados da literatura sustentam a hipótese de maior probabilidade da transmissão viral e patogênese fetal no primeiro trimestre de gravidez (El Costa e cols., 2016; Tabata e cols., 2016). No entanto, em alguns casos, a falta de registro do período gestacional em que a mãe foi acometida pela infecção e a necessidade de estudos longitudinais, deixam em aberto a confirmação do real risco para o feto nos diferentes períodos gestacionais. Diante disto, investigamos a susceptibilidade de explantes de placenta a termo e observamos que tanto a membrana coriônica quanto as vilosidades foram susceptíveis a infecção. Esses dados corroboram com o observado por outros grupos que detectaram o vírus Zika em placentas de mães infectadas em diferentes estágios de gestação (Noronha e cols., 2016; Martines e cols., 2016). O mesmo foi demonstrado em modelo de infecção de primata não humano, confirmando que placentas do final da gestação são vulneráveis a infecção (Coyne e cols., 2016). Até o momento não há dados na literatura sobre a infecção de explantes de membrana coriônica pelo ZIKV *ex vivo*, esta permissividade esta sendo relatada pela primeira vez, reforçando a importância deste tecido no contexto da fisiopatologia da síndrome congênita do vírus Zika, possibilitando a ocorrência de uma rota adicional a placentar e paraplacentar descritas na literatura (Tabata e cols., 2016). Nesse estudo é sugerido que na rota paraplacentar o ZIKV infecta células da decídua parietal, se propaga para membrana amniótica alcançando o líquido amniótico para infectar o feto. Nossos dados complementam este estudo, sugerindo que a membrana coriônica infectada possa transferir o vírus para a membrana amniótica dado seu estreito contato.

Quando as vilosidades coriônicas foram infectadas, foi observada a presença do antígeno viral somente na localização de células vimentinas+, sugerindo que a infecção não ocorra em células CK-7+. De fato, dados da literatura mostram que sinciotrofoblastos de placenta a termo não são permissivos a infecção pelo ZIKV, o estudo mostrou que a imunidade inata confere proteção à superfície das vilosidades coriônicas através da secreção de interferon tipo III (Bayer e cols., 2016). No entanto, foi demonstrado baixo perfil de infecção em citotrofoblastos e células CD68+ presentes no interior de explantes de vilos do primeiro trimestre da gestação utilizando as Cepas MR766 e Nica1-16, porém sinciotrofoblastos, mesmo em placentas de primeiro trimestre não foram infectados (Tabata e cols., 2016). Interessante, que em

nosso estudo a detecção do antígeno viral colocalizado com a marcação de vimentina no espaço intervilloso, sugere que a infecção possa estar ocorrendo em células mesenquimais, fibroblastos e até mesmo em células de Hofbauer, como demonstrado por outros autores (Quick e cols., 2016; Noronha e cols., 2016; Tabata e cols., 2016). Já os resultados obtidos com as culturas de esferóides revelou marcação da proteína viral em todo tecido não permitindo a identificação do tipo celular infectado. De fato, quando os esferóides foram fenotipados com anti-CK-7 e anti-vimentina a marcação pelos dois anticorpos também ocorreu em todo tecido, só foi possível quantificar o número de células de cada marcador pelo *Software Cell Profiler™*, reforçando a necessidade da análise por Microscopia Confocal a Laser para identificação do tipo celular infectado, por se tratar de um modelo 3D. É importante ressaltar que esta sendo demonstrado pela primeira vez o modelo experimental 3D de explante primário de placenta humana a termo permissivo a infecção por uma Cepas viral Brasileira. Com relação a infecção das células que migraram deste tecido os resultados não foram reprodutíveis, logo uma melhor caracterização fenotípica deverá ser conduzida, bem como o aprimoramento do protocolo de isolamento de citotrofoblastos funcionais, conforme realizado por outros autores (Kolokoltsova e cols., 2017; Clabault e cols., 2017; Li & Schust, 2015).

Nossos resultados revelaram que as culturas primárias de células amnióticas de placenta a termo foram suscetíveis a infecção de modo tempo-dependente e de acordo com a baixa carga viral empregada. A vulnerabilidade deste tipo celular a infecção pelo ZIKV havia sido relatada em células de placenta do 2º e 3º trimestres gestacional, sendo que neste estudo as células do 2º trimestre produziram títulos virais cerca de 6 a 8 vezes mais altos do que as de placenta a termo, este dado pode estar relacionado às cepas virais utilizadas, a MR766; Nica1-16 e Nica 2-16, altamente virulentas (Tabata e cols., 2016). Contudo, o interessante dos nossos achados foi que comparando as diferentes susceptibilidades encontradas entre os perfis fenotípicos das células isoladas da membrana fetal frente a mesma carga viral (MOI 1 e 20), incluindo amnion e córion, foi observado que células CK-7+ foram mais permissivas a infecção.

Como relatado anteriormente, as células derivadas do córion são pouco exploradas na literatura, possivelmente devido a heterogeneidade das culturas. Por isso, achamos pertinente explorar os resultados com células obtidas da membrana coriônica, a fim de contribuir com a geração de conhecimento sobre este importante

anexo embrionário. A análise ultraestrutural destas células confirmou o caráter heterogêneo das culturas, porém com uma predominância das células sugestivas de fibroblastos. O mesmo perfil morfológico fibroblastóide foi observado em análise ultraestrutural por Winram e colaboradores (1998). Interessante, que demonstramos pela primeira vez a presença de partículas virais neste tipo celular, que apresentou intensa desorganização ultraestrutural quando infectada, semelhante às descritas em outros tipos celulares (Evan e cols., 2017; Offerdahl e cols., 2017; Cortese e cols., 2017) e mesmo frente a infecção por outros Flavivirus como, DENV (Junjhon e cols., 2014; Gangodkar e cols., 2010; Welsch e cols., 2009), vírus Langat (Offerdahl e cols., 2012) e vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) (Miorin e cols., 2013; Bíly e cols., 2015), onde o Retículo Endoplasmático é drasticamente alterado pela replicação e encapsidação viral.

Culturas primárias de células coriônicas CK+, por serem mais susceptíveis as infecções foram utilizadas para os testes de reposicionamento do fármaco Annita®. Os dados obtidos dos ensaios experimentais demonstraram uma excelente atividade antiviral do Annita®, avaliada pela excelente redução do percentual de células infectadas, mas também pela redução da intensidade de fluorescência frente as diferentes doses, sugerindo uma diminuição da replicação viral na célula hospedeira. O que corrobora com a diminuição do número de cópias de RNA viral e do efeito citopático, observado pela redução de partículas infecciosas dos sobrenadantes das culturas tratadas em comparação com as culturas não tratadas. Além dos resultados promissores alcançados pelo tratamento com NTZ na cultura de células isoladas da placenta humana, importante, o fármaco também exibiu atividade antiviral nos explantes da membrana fetal, que mais se aproxima do organismo vivo. O tratamento protegeu as membranas amnióticas e coriônicas do efeito citopático viral, mantendo a organização e arquitetura tecidual quando comparado ao controle não infectado. Obviamente, serão necessários testes em culturas de trofoblastos primários e explantes da vilosidade coriônica, que são as principais células funcionais da placenta humana, mas os dados são motivadores.

A atividade microbicida da Nitazoxanida (NTZ), princípio ativo do medicamento Annita®, já havia sido demonstrada sobre diferentes patógenos como, parasitas (Chan-Bacab e cols., 2009), Mycobacterium (Bailey e cols., 2017; Harausz e cols., 2016) e vírus vaccínia (Hickson e cols., 2018) e também contra alguns vírus da família

Flaviviridae, inclusive essa droga está na fase II dos ensaios clínicos para o tratamento da hepatite C crônica nos Estados Unidos (Nikolova e cols., 2014; Shi e cols., 2014; Rossignol e cols., 2009).

Os achados do nosso estudo corroboram com os dados publicados por Cao e colaboradores (2017) que utilizando culturas de células Vero infectadas com ZIKV, observou que o tratamento com NTZ inibiu a proliferação viral de forma dose dependente, diminuindo tanto o número de partículas infecciosas no sobrenadante das culturas quanto a expressão da proteína E do ZIKV por imunofluorescência. Os autores também demonstraram que a atividade de NTZ não ocorre na etapa de adsorção viral. De fato, em nosso trabalho também realizando o tratamento antes da infecção e na etapa de adsorção viral não foi possível observar o efeito antiviral (dados não mostrados).

A Nitazoxanida também foi eficaz contra DENV-2 em cultura de células Vero com tratamento após 2h de infecção, neste estudo quando o tratamento foi realizado 5 e 10h após infecção houve uma diminuição no efeito antiviral, sugerindo que NTZ exerce seu efeito em momentos iniciais da infecção em cultura de células (Meneses e cols., 2013). Este fato também foi visto por Shi e colaboradores (2014) contra o vírus da encefalite japonesa (JEV) em cultura de células BHK-21, o tratamento com NTZ em diferentes momentos da infecção viral, antes e após 10h de tratamento, não demonstrou efeito sobre a replicação viral de JEV, o efeito antiviral foi observado somente quando o tratamento foi realizado após 2h de infecção. Quando camundongos foram desafiados com doses letais do vírus da encefalite japonesa e tratados 1 dia após a infecção com doses diárias por via intragástrica de 100 mg/kg de Nitazoxanida houve proteção dos animais (Shi e Cols.,2014).

No entanto, no presente estudo utilizamos o fármaco já formulado, o que representa vantagens como, estar disponível nas farmácias e poder ser administrado em gestantes, pois é aprovado pela FDA na categoria B, vale ressaltar que o Annita® só deve ser utilizado durante a gravidez quando seu benefício justifica o risco potencial para o feto e deve ser orientado pelo médico.

Juntos esses dados demonstram que o uso de Annita® durante surtos de ZIKV congênito podem ser eficientes em bloquear transmissão vertical de ZIKV e proteger o feto dos efeitos teratogênicos induzidos por ZIKV. Especialmente por se tratar de um fármaco seguro que pode ser administrado oralmente para uso terapêutico numa situação de emergência pública,

Até o momento não há estudos tão minuciosos quanto a transmissão congênita do ZIKV em momentos tardios da gestação em humanos e nosso modelo pode auxiliar na elucidação da dinâmica do ZIKV na placenta de terceiro trimestre. Como todo modelo experimental, o modelo proposto apresenta vantagens como a fácil obtenção após o parto e perpassa as questões éticas envolvidas, uma vez que a placenta é descartada após o parto. Mas apresenta como desvantagem a necessidade de amostras extremamente viáveis.

## 6. CONCLUSÕES

- 1) Os resultados do sequenciamento da amostra viral confirmam que o trabalho foi realizado com a cepa circulante de ZIKV no Brasil.
- 2) O perfil fenotípico das células amnióticas foi homogêneo CK-7+, enquanto que das células coriônicas revelou heterogeneidade CK-7+ ou Vimentina +.
- 3) Será necessário o aumento do número amostral de placenta avaliadas para melhor caracterização fenotípica das células obtidas por dissociação enzimática.
- 4) Foi confirmada a susceptibilidade de explantes e células de placenta humana a termo a infecção com a cepa de ZIKV<sup>BR</sup>. O que valida este modelo de cultivo *ex vivo* para estudo dos aspectos biológicos das interações vírus-célula hospedeira. Além de representar um excelente modelo de avaliação de moléculas *hits* antivirais.
- 5) Foi demonstrada uma variação de susceptibilidade entre os diferentes tipos celulares, sugerindo uma relação com carga viral e fenótipo celular.
- 6) Importaneamente, foi demonstrada a infecção de explantes da membrana coriônica, bem como de células obtidas desse tecido. Este dado complementa os da literatura que até o momento demonstraram a infecção somente de explantes e células da membrana amniótica.
- 7) A infecção de explantes da membrana coriônica também contribui para o entendimento das possíveis rotas de infecção propostas na literatura, uma vez que é extremamente vascularizada e aderente a membrana amniótica.
- 8) A droga Nitazoxanida exibiu elevada atividade antiviral (93-100%) já numa concentração baixa (25-50µg/mL) em culturas de células coriônicas, o que estimula o teste em outros tipos celulares da Placenta humana em diferentes estágios gestacionais e em modelo de infecção animal.
- 9) Apesar de preliminar, o efeito antiviral do fármaco Annita® parece ser reprodutível quando o tratamento foi realizado em explantes da membrana fetal, microambiente tecidual que melhor se assemelha as condições no organismo vivo.

10) Interessante, que esta ação foi verificada com o fármaco já formulado (Annita®), disponível nas prateleiras, de baixo custo e classificado na categoria B pela *FDA*, que significa permitir a administração em gestantes.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abaza H, El-Zayadi AR, Kabil SM, Risk H (1998) Nitazoxanide in the treatment of patients with intestinal protozoan and helminthic infections: a report n 546 patients in Egypt. *Curr Ther Res*, 59(2): 116-121.
- Aldo P, You Y, Szigeti K, Horvath TL, Lindenbach B, Mor G. HSV - 2 enhances ZIKV infection of the placenta and induces apoptosis in first - trimester trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol*2016; 76:348–357.
- ANNITA: nitazoxanida. Rio de Janeiro: Farmoquímica. (2007). Bula do medicamento.
- Ashburn TT, Thor KB (2004) Drug Repositioning Identifying and Developing New Uses for Existing Drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3: 673-683.
- Atif M, Azeem M, Sarwar MR, Shahid S, Javaid S, Ikram, Scahill S. WHO/INRUD prescribing indicators and prescribing trends of antibiotics in the Accident and Emergency Department of Bahawal Victoria Hospital, Pakistan (2016). *Springer Plus*, 5(1): 1928.
- Bailey, M. A., Na, H., Duthie, M. S., Gillis, T. P., Lahiri, R., & Parish, T. (2017). Nitazoxanide is active against *Mycobacterium leprae*. *PLoS ONE*, 12(8), e0184107. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0184107>.
- Barrows N J, Campos RK, Steven T, Powell AR, Shelton SB, Mariano AG-B (2016) A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell Host & Microbe*, 20: 1-12.
- Bauman MU, Deborde S, Illsley NP (2002) Placental glucosetransfer and fetal growth. *Endocrine*, 19:13-22.
- Baurakiades E, Martins A, Moreschi NV, Souza C, Abujamra K, Saito A (2011) Histomorphometric and immunohistochemical analysis of infectious agents, T-cel lsubpopulations and inflammatory adhesion molecules in placentas from HIV-sero positive pregnant women. *Diagn Pathol*, 6: 101.
- Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, Bramley JC, Morosky S, Marques ET Jr (2016) Type III Interferons produced by placental trophoblasts confer protection against Zika virus infection. *Cell Host Microbe*, 19(5): 705-712.
- Becak, W.; Paulete, J. *Tecnicas de citologia e histologia*. Rio de Janeiro: Liv. Tecnicos e Cientificos Ed., 1976. v.2 574 p.
- Belardo G, Cenciarelli O, La Frazia S, Rossignol JF, Santoro MG (2015) Synergistic Effect of Nitazoxanide with Neuraminidase Inhibitors against Influenza A Viruses *In Vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 1061–1069.
- Benirschke P, Kaufmann P (2000) *Pathology of the human placenta*. Berlin7 Springer.
- Bílý T, Palus M, Eyer L, Elsterová J, Vancová M, Růžek D. (2015) Electron Tomography Analysis of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Human Neurons. *Sci Rep*. 5:1074510.
- Blackburn ST (2003) *Maternal, fetal & neonatal physiology: a clinical perspective*. 2nd ed. St. Louis, USA7 Saunders.
- Bourne GL (1960) The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 79(6): 1070-1073.
- Brasil P, Pereira JP, Moreira ME, Nogueira RM, Damasceno R, Wakimoto L, Nielsen-Saines MK (2016) Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *The New England Journal of Medicine*, 375(24): 2321-2334.

- Brolio MP, Ambrósio CE, Francioli AR, Morini AC, Guerra RR, Miglino MA (2011) Placental barrier and their nutritional transfer function. *Rev Bras Reprod Anim*, 34(4): 222-232.
- Bullard-Feibelman KM, Govero J, Zhu Z, Salazar V, Veselinovic M, Diamond MS, Geiss BJ (2017) The FDA-approved Drug Sofosbuvir Inhibits Zika Virus Infection. *Antiviral Research*, 137: 134–140.
- Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, Araujo ESM, de Sequeira PC, de Mendonça MCL, de Oliveira L, Tschoeke DA, Schrago CG, Thompson FL, Brasil P, Dos Santos FB, Nogueira RMR, Tanuri A, de Filippis AMB (2016) Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*, 16(6): 653-660.
- Cao B, Diamond MS, Mysorekar IU (2017) Maternal-Fetal Transmission of Zika Virus: Routes and Signals for Infection. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 37(7): 287-294.
- Cao J, Forrest JC, Zhang X (2015) A screen of the NIH collection small molecule library identifies potential coronavirus. *Antiviral Res*, 114: 1-10.
- Cao RY, Xu YF, Zhang TH, Yang JJ, Yuan Y, Hao P, Shi Y, Zhong J, Zhong W (2017) Pediatric Drug Nitazoxanide: A Potential Choice for Control of Zika. *Open Forum Infect Dis*, 34(1).
- Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, Dub T, Baudouin L, Teissier A, Larre P, Vial AL, Decam C, Choumet V, Halstead SK, Willison HJ, Musset L, Manuguerra JC, Despres P, Fournier E, Mallet HP, Musso D, Fontanet A, Neil J, Ghawché F (2016) Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*, 9(387): 1531-1539.
- Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP (2014) Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*, 20:1085–1086.
- Cariappa R, Heath-Monnig E, Smith CH (2003) Isoforms of aminoacid transporters in placental syncytiotrophoblast: plasma membrane localization and potential role in maternal/fetal transport. *Placenta*, 24: 713-726.
- Centers for Disease Control (CDC). Zika: The Basics of the Virus and How to Protect against It (2016) Atlanta, GA, USA.
- Chan JF, Chik KK, Yuan S, Yip CC, Zhu Z, Tee KM, Tsang JO, Chan CC, Poon VK, Lu G (2017) Novel antiviral activity and mechanism of bromocriptine as a Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitor. *Antiviral Res*, 141: 29-37.
- Chan JF, Choi GK, Yip CC, Cheng VC, Yuen KY (2016) Zika fever and congenital Zika syndrome: an unexpected emerging arboviral disease. *J Infect*, 72: 507-524.
- Chan-Bacab MJ, Hernández-Núñez E, Navarrete-Vázquez G. Nitazoxanide, tizoxanide and a new analogue [4-nitro-*N*-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)benzamide; NTB] inhibit the growth of kinetoplastid parasites (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*) *in vitro*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. V63, n6; p1292–1293.
- Charrel RN, Leparac-Goffart I, Pas S, de Lamballerie X, Koopmans M, Reusken C (2016) State of knowledge on Zika virus for an adequate laboratory response. *Bull World Health Organ*. E-pub: 10.
- Chen LH, Hamer DH (2016) Zika Virus: Rapid Spread in the Western Hemisphere. *Ann Intern Med*, 164: 613–615.
- Clabault H, Laurent L, Sanderson JT, Vaillancourt C. (2018) Isolation and Purification of Villous Cytotrophoblast Cells from Term Human Placenta. *Methods Mol Biol*. 1710: 219-231. doi: 10.1007/978-1 4939-7498-6\_17.
- Cortese M, Goellner S, Acosta EG, Neufeldt CJ, Oleksiuk O, Lampe M, Haselmann U, Funaya C, Schieber N, Ronchi P, Schorb M, Pruunsild P, Schwab Y, Chatel-Chaix L, Ruggieri A,

- Bartenschlager R (2017) Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *CellRep*.18:2113–2123.
- Costa F, Sarno M, Khouri R, de Paula Freitas B, Siqueira I, Ribeiro GS, Ribeiro HC, Campos GS, Alcântara LC, Reis MG, Weaver SC, Vasilakis N, Ko AI, Almeida AR (2016) Emergence of congenital Zika syndrome: viewpoint from the front lines. *Ann Intern Med*, 164(10): 689–691.
- Coyne CB, Lazear HM (2016) Zika virus reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol* 14:707–715.
- Da-Silva S, Oliveira SMD, Jardim ACA (2018) Review of the Ongoing Research on Zika Virus Treatment. *Viruses*, 10: 255.
- Delorme-Axford E, Bayer A, Sadovsky Y, Coyne CB. Autophagy as a mechanism of antiviral defense at the maternal-fetal interface. *Autophagy*. 2013; 9:2173–4.
- Delvecchio R, Higa LM, Pezzuto P, Valadão AL, Garcez PP, Monteiro FL, Loiola EC, Dias AA, Silva FJ, Aliota MT, Caine EA, Osorio JE, Bellio M, O'Connor DH, Rehen S, de Aguiar RS, Savarino A, Campanati L, Tanuri A (2016) Chloroquine inhibits Zika Virus infection in different cellular models. 8(12). pii: E322.
- Desai SK, Hartman SD, Jayarajan S, Liu S, Gallicano GI (2017) Zika Virus (ZIKV): a review of proposed mechanisms of transmission and associated congenital abnormalities. *American Journal of Stem Cells*, 6(2):13-22.
- Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ (1952) Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 46(5): 509-520.
- Donald B, Bailey J, Liana O, Ventura (2018) The Likely Impact of Congenital Zika Syndrome on Families: Considerations for Family Supports and Services. *Pediatrics*, 141/ISSUE Supplement 2.
- D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, de Lamballerie X, Hubert B, Piorowski G, Maquart M, Descamps D, Damond F, Leparac-Goffart I (2016) Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N Engl J Med*, 374(22): 2195-2198.
- Dua HS, Forrester JV (2004) The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound cell culture surface. *Transplantation*, 77(3): 379-385.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB (2009) Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*, 360: 2536-2543.
- El Costa H, Gouilly J, Mansuy JM, Chen Q, Levy C, Cartron G, Veas F, Al-Daccak R, Izopet J, Jabrane-Ferrat N (2016) ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. *Rep*, 6: 35296.
- Fauci AS, Morens DM (2016) Zika virus in the Americas - Yet another *Arbovirus* threat. *N Engl J Med*, 374:601-604.
- Ferreira BSG, Scheutz M, Levin M (2017) Introducing simulated stem cells into a bio-inspired cell-cell communication mechanism for structure regeneration. 1-8.
- Fink SL, Vojtech L, Wagoner J, Slivinski NSJ, Jackson KJ, Wang R, Polyak SJ (2018) The Antiviral Drug Arbidol Inhibits Zika Virus. *Scientific Reports*, 8:8989.
- Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR (2008) Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signaling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update*, 14: 335-344.
- Frost JM, Moore GE (2010) The Importance of Imprinting in the Human Placenta. *PLoS Genetics*, 6(7): e1001015.

- Gangodkar S, Jain P, Dixit N, Ghosh K, Basu A. Dengue virus-induced autophagosomes and changes in endomembrane ultrastructure imaged by electron tomography and whole-mount grid-cell culture techniques, *Journal of Electron Microscopy*, Volume 59, Issue 6, 1 December 2010, Pages 503–511.
- Gargioni, R. Avaliação do nicho molecular de células-tronco hematopoéticas e mesenquimais em placenta humana: caracterização estrutural e ultraestrutural. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2014.
- Ginier M, Neumayr A, Günther S, Schmidt-Chanasit J, Blum J (2016) Zika without symptoms in returning travellers: what are the implications? *Travel Med Infect Dis*, 14: 16-20.
- Ginier M, Neumayr A, Günther S, Schmidt-Chanasit J, Blum J (2016) Zika without symptoms in returning travellers: what are the implications? *Travel Med Infect Dis*, 14(1): 16-20.
- Gomez Dominguez R. Human amniotic epithelial cells: isolation and characterisation. Giessen: Lauffersweiler Publishers; 2008.
- Gramignoli R, Srinivasan RC, Kannisto K, Strom SC. Isolation of human amnion epithelial cells according to current good manufacturing procedures. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2016.
- Green AM, Beatty PR, Hadjilaou A, Harris E (2014) Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol*, 426(6): 1148-1160.
- Grossman JH, Dennis LG (1987) Infections affecting the placenta. In: Lavery JP, editor. *The human placenta*. Maryland: Aspen Publishers Inc. pp. 131–54.
- Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG (2004) Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*, 114(5): 397-407.
- Haffizulla J, Hartman A, Hoppers M, Resnick H, Samudrala S, Ginocchio C, Bardin M, Rossignol JF (2014) Effect of nitazoxanide in adults and adolescents with acute uncomplicated influenza: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Infect Dis*, 14: 609-618.
- Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Talignani L, Thomas F, Cao-Lormeau VM, Choumet V, Briant L, Desprès P, Amara A, Yssel H, Missé D (2015) Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*, 89(17): 8880-8896.
- Handwerger S, Freemark M (2000) The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab*, (4): 343-356.
- Harausz EP, Chervenak KA, Good CE, Jacobs MR, Wallis RS, Sanchez-Felix M, Boom WH Harausz, E. P., Chervenak, K. A., Good, C. E., Jacobs, M. R., Wallis, R. S., Sanchez-Felix, M., Boom WH. (2016). Activity of Nitazoxanide and Tizoxanide against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and in whole blood culture. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 98, 92–96. <http://doi.org/10.1016/j.tube.2016.03.002>
- Harrison SC (2008) Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 15: 690-698.
- Hasan, S.S.; Sevana, M.; Kuhn, R.J.; Rossmann, M.G. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018, 25, 13–20.
- Hassan N. Ghasem Y. (2014). Anticancer effects of human amniotic membrane and its epithelial cells. *Medical hypotheses*. 82. 10.1016/j.mehy.2014.01.034.
- Hayes EB (2009) Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis*, 15(9): 1347-1350.
- Hickson SE, Margineantu D, Hockenbery DM, Simon JA, Geballe AP (2018). Inhibition of vaccinia virus replication by nitazoxanide. *Virology*. 518:398-405.

- Illsley NP (2000) Glucose transporters in the human placenta. *Placenta*, 21:14-22.
- Junjhon J, Pennington JG, Edwards TJ, Perera R, Lanman J, Kuhn RJ (2014) Ultrastructural characterization and three-dimensional architecture of replication sites in dengue virus-infected mosquito cells. *J Virol*. 88:4687–97. doi: 10.1128/JVI.00118-14.
- Kaufmann P, Burton G (1994) Anatomy and genesis of the placenta. In: Knobil E and Neill JD. *The physiology of reproduction*. 2 ed. New York: Raven Press.
- Kim C, Romero R, Chaemsaithong P, Kim J (2015) Chronic inflammation of the placenta: definition, classification, pathogenesis, and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol*, 213(4): S53-S69.
- Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF (1986) Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*. 118(4):1567-82.
- Knöfler M, Pollheimer J (2013) Human placental trophoblast invasion and differentiation: A particular focus on Wnt signaling. *Frontiers in genetics*, 4: 190.
- Kokernot RH, Casaca VM, Weinbren MP, McIntosh BM (1965) Survey for antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of indigenous residents of Angola. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 59(5): 563-570.
- Kolokoltsova TD, Saburina IN, Zurina IM, Gorkun AA, Kosheleva NV, Repin VS, Poltavtseva RA, Sukhikh GT (2017) Isolation and characterization of trophoblasts from enzymatic explants of human term placenta. *Hum Cell*, (4): 249-257.
- Kolokoltsova TD, Saburina IN, Zurina IM, Gorkun AA, Kosheleva NV, Repin VS, Poltavtseva RA, Sukhikh GT (2017) Isolation and characterization of trophoblasts from enzymatic explants of human term placenta. *Hum Cell*, 30(4): 249-257.
- Korba BE, Elazar M, Lui P, Rossignol JF, Glenn JS (2008) Potential for hepatitis C virus resistance to nitazoxanide or tizoxanide. *Antimicrob Agents Chemothe*, 52(11): 4069-4071.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH (2002) Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108(5): 717-725.
- Kumpel BM, Manoussaka MS (2012) Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox Sang*, 102: 2-12.
- Kwong JC, Druce JD, Leder K (2013) Zika Virus Infection Acquired During Brief Travel to Indonesia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(3): 516-517.
- Lee SH, Tseng SC (1997) Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol*, 123(3): 303-312.
- Leiser R, Kaufmann P (1994) Placental structure: in a comparative aspect. *Experimental and Clinical Endocrinology*, 102: 122-134.
- Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, Zhang N, Shi L, Qin CF, Xu Z (2016) Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Stem Cell*, 19(1): 120-126.
- Li, L. Schust, DJ. (2015). Isolation, purification and in vitro differentiation of cytotrophoblast cells from human term placenta. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 13, 71.
- Lindenbach BD, Rice CM (1997) Trans-Complementation of Yellow Fever Virus Ns1 Reveals a Role in Early Rna Replication. *J Virol*, 71: 9608-9617.

- Malassine A, Cronier L (2002) Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine*, 19:3-11.
- Malhotra C, Jain AK (2014) Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. *World J Transplant*, 4(2):111-121.
- Mamede AC (2017). Membrana amniótica uma opção terapêutica para o cancro? (Tese doutorado). Covilhã, Maio de 2017.
- Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, Botelho MF (2012) Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res*, 349(2): 447-458.
- Marostica LL (2011) Análise dos efeitos do mesilato de imatinibe em cultura de células-tronco mesenquimais humanas. 89 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) -Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis.
- Martines RB, Bhatnagar J, Keating MK, Silva-Flannery L, Muehlenbachs A, Gary J, et al. Evidence of Zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses - Brazil, 2015. *MMWR*. 2016; 65(6):1–2.
- Martines RB, Bhatnagar J, de Oliveira RAM, Davi HP, Iglezias SD, Kanamura CT, Keating MK, Hale G, Silva-Flannery L, Muehlenbachs A, Ritter J, Gary J, Rollin D, Goldsmith CS, Reagan-Steiner S, Ermias Y, Suzuki T, Luz KG, de Oliveira WK, Lanciotti R, Lambert A, Shieh WJ, Zaki SR (2016) Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet*, 388: 898–904.
- McCarthy M (2016) Zika virus outbreak prompts US to issue travel alert to pregnant women. *BMJ*, 352: i306.
- Mecharles S, Herrmann C, Poullain P (2016) Acute myelitis due to Zika virus infection. *Lancet*, 387:1481.
- Meneses, M.D.S., Duarte, R.S., Migowski, E.R., Ferreira, D.F., 2013. In vitro study on the effects of nitazoxanide on the replication of dengue virus and yellow fever virus. Poster Presented at the 28th International Conference on Antiviral Research (ICAR).
- Miki T, Marongiu F, Dorko K, Ellis E, Strom SC. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2010.
- Miki T, Marongiu F, Dorko K, Ellis EC, Isolation of amniotic epithelial stem cells..*Strom SCCurr Protoc Stem Cell Biol*. 2010 Jan; Chapter 1:Unit 1E.3. doi: 10.1002/9780470151808.sc01e03s12.
- Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2011; 2: 25.
- Miorin L, Romero-Brey I, Maiuri P, Hoppe S, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R, Marcello A. Three-dimensional architecture of tick-borne encephalitis virus replication sites and trafficking of the replicated RNA. *J Virol*. 2013; 87:6469–81. doi: 10.1128/JVI.03456-12.
- Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, Vesnaver Vipotnik T, Fabjan Vodusek V, Vizjak A, Pižem J, Petrovec M, Avšič Županc T (2016) Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med* 374:951–958
- Molina, PE (2014) Fisiologia endócrina. 4. ed. São Paulo: AMGH.
- Moore, K (2013) Embriologia Básica. 8ª Edição. Elsevier. 376p.
- Motedayyen, H., Esmaeil, N., Tajik, N., Khadem, F., Ghotloo, S., Khani, B., & Rezaei, A. (2017). Method and key points for isolation of human amniotic epithelial cells with high yield, viability and purity. *BMC Research Notes*, 10, 552. <http://doi.org/10.1186/s13104-017-2880-6>

- Murphy SV, Kidyoor A, Reid T, Atala A, Wallace EM, Lim R. Isolation, cryopreservation and culture of human amnion epithelial cells for clinical applications. *J Vis Exp*. 2014.
- Musso D, Gubler DJ (2016) Vírus Zika. *Revisões de Microbiologia Clínica*, 29(3): 487-524.
- Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H, Abolghasemi H (2014) Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: a new anti-tumor therapeutic strategy. *Cytotherapy*, 16(1): 33-40.
- Nikolova K, Gluud C, Grevstad B, Jakobsen JC. Nitazoxanide for chronic hepatitis C. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 4. Art. No.: CD009182. DOI: 10.1002/14651858.CD009182.pub2.
- Noronha L, Zanluca C, Azevedo MLV, Luz KG, dos Santos CND (2016) Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 111(5): 287-293.
- Oduyebo T, Petersen EE, Rasmussen SA, Mead PS, Meaney-Delman D, Renquist CM, Ellington SR, Fischer M, Staples JE, Powers AM, Villanueva J, Galang RR, Dieke A, Muñoz JL, Honein MA, Jamieson DJ (2016) Update: interim guidelines for health care providers caring for pregnant women and women of reproductive age with possible Zika virus exposure—United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly*, Rep 65:122–127.
- Oduyebo, T., Polen, K.D., Walke, H.T. et al. Update: interim guidance for health Care providers caring for pregnant women with possible Zika virus exposure - United States (including U.S. Territories), July 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2017 Jul 28; 66: 781–793
- Offerdahl DK, Dorward DW, Hansen BT, Bloom ME. A Three-Dimensional Comparison of Tick-Borne Flavivirus Infection in Mammalian and Tick Cell Lines. *PLoS One*. 2012;7. doi: 10.1371/journal.pone.0047912.
- Offerdahl DK, Dorward DW, Hansen BT, Bloom ME. Cytoarchitecture of Zika virus infection in human neuroblastoma and *Aedes albopictus* cell lines. *Virology*. 2017;501:54–62. doi: 10.1016/j.virol.2016.11.002.
- Osmond DT, King RG, Brennecke SP, Gude NM (2001) Placental glucose transport and utilisation is altered at term in insulin-treated, gestational-diabetic patients. *Diabetologia*, 44(9): 1133-1139.
- Padro KM (2012) Análise comparativa do mecanismo imunoregulador gerado pela indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) na interface materno-placentaria entre mães que receberam transplante renal e mães saudáveis. 88f. Dissertação (Mestrado em biologia celular e tecidual) – Instituto de ciências biomédicas, universidade de São Paulo, São Paulo.
- Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhning HJ, Evangelista M, Strom SC (2008) Concise review: Isolation and characterization of cells from human term placenta: Outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. *Stem Cells*, 26(2): 300–311.
- Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ (2008) Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral research*, 80(1):11-22.
- Petersen EE, Staples JE, Meaney-Delman D (2016) Interim guidelines for pregnant women during a Zika virus outbreak—United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 65:30-33.
- Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA (2016) Zika Virus. *N Engl J Med*. 374(16): 1552-1563.
- Portal da saúde. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/24/Informe-Epidemiol-gico-n-27-SE-20-2016-24mai2016-12h00.pdf>. Acesso em: 08.07.2018.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Feb 28;114(9):E1587-E1596. doi: 10.1073/pnas.1616097114. Epub 2017 Feb 13.
- Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL, McDonald CE, Ma H, O'Neal JT, Rajakumar A, Wrammert J, Rimawi BH, Pulendran B, Schinazi RF, Chakraborty R, Suthar MS (2016) Zika virus infects human placental macrophages. *Cell Host Microbe*, 20: 83–90.
- Ramuta TŽ, Kreft ME (2018) Human Amniotic Membrane and Amniotic Membrane-Derived Cells: How Far Are We from Their Use in Regenerative and Reconstructive Urology? *Cell Transplant*, 27(1): 77-92.
- Ribeiro MR, Moreli JB, Marques RE, Papa MP, Meuren LM, Rahal P, de Arruda LB, Oliani AH, Oliani DCMV, Oliani SM, Narayanan A, Nogueira ML(2018) Zika virus infected human fullterm placental explants display proinflammatory responses and undergo apoptosis. *Arch Virol*. 2018.
- Ritter JM, Martines RB, Zaki SR (2016) Zika virus: pathology from the pandemic. *Arch Pathol Lab Med*.
- Ritter JM, Martines RB, Zaki SR (2017) Zika Virus: Pathology From the Pandemic. *Arch Pathol Lab Med*, 141(1): 49-59.
- Rocha S.C.M., Baptista C.J.M. (2015) Biochemical Properties of Amniotic Membrane. In: Mamede A., Botelho M. (eds) *Amniotic Membrane*. Springer, Dordrecht.
- Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM (2010) Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*, 67(16): 2773-2786.
- Rodrigues LC (2016) Microcephaly and Zika virus infection. *Lancet*, 387(10033):2070-2072.
- Romark Laboratories L.C. Alinia<sup>®</sup> (nitazoxanide) prescribing information (2007).
- Romero CR, Guerrero LR, Muñóz GMR, Geyne CA (1997) Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91(6): 701-703.
- Romero R (2006) Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 11(5): 317-326.
- Rossignol JF (2014) Nitazoxanide: a first-in-class broad-spectrum antiviral agent. *Antiviral Res*, 110: 94–103.
- Rossignol JF, Santoro MG (2014) Activity of thiazolides against other respiratory viruses than influenza Programme & Abstract Book, *Influenza and Other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. Third ISIRV-Antiviral Group Conference*, Abstract P54, 81.
- Rossignol JF, Cavier R (1975) Synthesis and antiparasitic activity of 2-benzamido nitrothiazoles. *Chem Abstr*, 83: 28216n.
- Rossignol JF, Elfert A, El-Gohary Y, Keefe EB (2009) Improved virologic response in chronic hepatitis C genotype-4. Patients given nitazoxanide, peginterferon, and ribavirin. *Gastroenterology*, 136: 856-862.
- Rossignol JF, El-Gohary Y (2006) Nitazoxanide in treatment of viral gastroenteritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial *Aliment. Pharmacol Ther*, 24: 1423-1430.
- Rossignol JF, La Frazia S, Chiappa L, Ciucci A, Santoro MG (2009) Thiazolides, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at post-translational level. *J Biol Chem*, 284: 29798-29808.



- Rossignol, E. D., Peters, K. N., Connor, J. H., & Bullitt, E. (2017). Zika Virus Induced Cellular Remodeling. *Cellular Microbiology*, 19(8), 10.1111/cmi.12740. <http://doi.org/10.1111/cmi.12740>.
- Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, Guillaumot L, Souares Y. (2014) Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014.
- Sacramento CQ, de Melo GR, de Freitas CS, Rocha N, Hoelz LV, Miranda M, Fintelman-Rodrigues N, Marttorelli A, Ferreira AC, Barbosa-Lima G, Abrantes JL, Vieira YR, Bastos MM, de Mello Volotão E, Nunes EP, Tschoeke DA, Leomil L, Loiola EC, Trindade P, Rehen SK, Bozza FA, Bozza PT, Boechat N, Thompson FL, de Filippis AM, Brüning K, Souza TM (2016) The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. *Sci Rep*, 24: 46777:46772.
- Sadler TW (2012) *Langman's Medical Embryology*. Baltimore, MD, USA: Lippincott Williams & Wilkins (Wolters Kluwer).
- Sadovsky Y, Clifton VL, Knöfler M. Editorial: ZIKA virus and placenta (2016). *Placenta*.
- Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, Rosário MS, Costa F, Archanjo G, Santos LA, Nery JN, Vasilakis N, Ko AI (2016) Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2): e0004517.
- Shennan DB, Boyd CAR (1987) Ion transport by the placenta: a review of membrane transport systems. *Biochim Biophys Acta*, 906: 437-457.
- Sheridan MA, Yunusov D, Balaraman V, Alexenko AP, Yabe S, Verjovski-Almeida S, Schust DJ, Franz AW, Sadovsky Y, Ezashi T, Roberts RM (2017). Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(9), E1587–E1596. <http://doi.org/10.1073/pnas.1616097114>
- Shi, Z., Wei, J., Deng, X., Li, S., Qiu, Y., Shao, D., Ma, Z. (2014). Nitazoxanide inhibits the replication of Japanese encephalitis virus in cultured cells and in a mouse model. *Virology Journal*, 11, 10. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-11-10>
- Shim JS, Liu JO (2014) Recent Advances in Drug Repositioning for the Discovery of New Anticancer Drugs. *International Journal of Biological Sciences*, 10(7): 654–663.
- ShiX J, Wei X, Deng S, Li Y, Qiu D, Shao B, Li K, Zhang F, Xue X, Wang Z (2014) Nitazoxanide inhibits the replication of Japanese encephalitis virus in cultured cells and in a mouse model. *Viol J*, 11.
- Sibley CP, Glazier JD, Greenwood SL, Lacey H, Mynett K, Speake P (2002) Regulation of placental transfer: the Na(+)/H(+) exchanger—a review. *Placenta*, 23:S39-46.
- Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen VV, Wills B (2012) Dengue. *N Engl J Med*, 366 (15): 1423-1432.
- Singh RD, Kuldeep M, Yashpal R, Muthannan K, Tiwari K, Ruchi S, Sharad S, Swati J, Sunil (2016) Zika Virus – Emergence, Evolution, Pathology, Diagnosis and Control: Current Global Scenario and Future Perspectives – A Comprehensive Review. *The Veterinary quarterly*. 36. *Vet Q*. 29:1-26.
- Sleeman VP, Mishin ZG, RJ Garten, A. Balish, A.M. Fry, J. Villanueva, J.Stevens, V. Gubave ra (2014) Antiviral susceptibility of variant influenza A (H3N2)v viruses isolated in the United States during 2011–2013. *Antimicrob Agents Chemother*, 58: 2045-2051.
- Smith SK (2000) Angiogenesis and implantation. *Hum Reprod*, 6: 59–66.
- Smithburn KC, Kerr JA, Gatne PB (1994) Neutralizing antibodies against certain viruses in the sera of residents of India. *J Immunol*, 72(4): 248-257.
- Stulc J (1997) Placental transfer of inorganic ions and water. *Physiol Rev*, 77: 805-836.

- Sullayman A, Deborah N, David CW, Jean-François R (2002) In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(1): 103-111.
- Svitkina TM. Ultrastructure of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* (2018) 54:1–8.
- Tabata T, Pettitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, Fang-Hoover J, Harris E, Pereira L (2016) Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe*, 20(2): 155-166.
- Tabatabaei M, Mosaffa N, Nikoo S, Bozorgmehr M, Ghods R, Kazemnejad S, et al. Isolation and partial characterization of human amniotic epithelial cells: the effect of trypsin. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2014; 6:10.
- Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, Yao B, Shin J, Zhang F, Lee EM, Christian KM, Didier RA, Jin P, Song H, Ming GL (2016) Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*, 10.
- Timothy, WL., Anderson, CL., Robson, M J.(2002)The Endothelium but not the Syncytiotrophoblast of Human Placenta Expresses Caveolae. *Placenta*, v.23, p.640-652.
- Tjioe KC (2015) Reposicionamento de fármacos no câncer de boca: Identificação de possíveis agentes. Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.
- Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci.* 2007;105: 215–228. doi: 10.1254/jphs.CR0070034.
- Uchide N, Obatake K, Yamada R, Sadanari H, Matsubara K, Murayama T, Ohyama K (2016) Regulation of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 Gene Expression in Cultured Human Fetal Membrane Cells by Influenza Virus Infection. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(12): 1912-1921.
- Van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts BL, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM (2007) Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J Virol*, 81(21): 12019-12028.
- Volume 40, A1.
- Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA (2016) Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res*, 130: 69–80.
- Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*. 2009; 5:365–75. doi: 10.1016/j.chom.2009.03.007.
- Winram, S. B., Jonas, M., Chi, E., & Rubens, C. E. (1998). Characterization of Group B Streptococcal Invasion of Human Chorion and Amnion Epithelial Cells In Vitro. *Infection and Immunity*, 66(10), 4932–4941.
- World Health Organization (WHO 2017). <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/10-march-2017/en/> Acesso em 05.07.18
- Yang PJ, Yuan WX, Liu J, Li JY, Tan B, Qiu C, Zhu XL, Qiu C, Lai DM, Guo LH, Yu LY. Biological characterization of human amniotic epithelial cells in a serum-free system and their safety evaluation. *Acta Pharmacol Sin.* 2018 Mar 22. doi: 10.1038/aps.2018.22.
- Zanluca C, de Melo VCA, Mosimann ALP, dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K (2015) First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), 569–572.

## ANEXO 01

Bula do Annita® nitazoxanida

Forma farmacêutica e apresentação Pó para suspensão oral - Embalagem contendo pó para 45 ml ou 100 ml, após reconstituição. Comprimido revestido - Embalagem contendo 6 ou 14 comprimidos revestidos.

### USO ADULTO E PEDIATRICO USO ORAL

Composição Cada comprimido revestido contém:  
nitazoxanida..... 500 mg;  
excipientes q.s.p.....1 comprimido revestido.  
(amido, amido pré-gelatinizado hipromelose, sacarose, amidoglicolato de sódio, água, talco, estearato de magnésio, ácido metacrílico , eudracolor amarelo, álcool isopropílico, trietilcitrato e acetona).

Cada ml de suspensão reconstituída contém:  
nitazoxanida.....20 mg;  
excipientes q.s.p.....1 ml  
(benzoato de sódio, sacarose, goma xantana, celulose microcristalina, ácido cítrico, citrato de sódio diidratado, corante vermelho nº 33, e aroma de morango)

### INFORMAÇÕES AO PACIENTE

Como este medicamento funciona? Annita® age contra vermes por meio da inibição de uma enzima indispensável à vida do parasita. O mesmo parece ocorrer em relação aos protozoários, embora outros mecanismos ainda não totalmente esclarecidos possam estar envolvidos. A ação sobre vírus se dá através da inibição da síntese da estrutura viral, bloqueando a habilidade do vírus de se multiplicar. O tempo médio de ação do medicamento está estimado entre duas a quatro horas após a sua administração.

Por que este medicamento foi indicado? Gastroenterites virais - Annita® é indicado no tratamento das gastroenterites virais causadas por Rotavírus e Norovírus.

Helminthíases – Annita® é um anti-helmíntico efetivo contra nematódeos, cestódeos e trematódeos, indicado no tratamento de Enterobius vermiculares, Ascaris

lumbricoides, Strongyloides stercoralis, Ancilostomíase, Trichuris trichiura, Taenia sp, Hymenolepis nana.

Amebíases – Annita® é indicado no tratamento da diarreia causada por amebíases intestinais agudas ou disenteria amebiana causada pelo complexo Entamoeba histolytica/dispar.

Giardíases - Annita® é indicado no tratamento da diarreia causada por Giardia lamblia ou Giardia intestinalis.

Criptosporidíase – Annita® é indicado no tratamento da diarreia causada por Cryptosporidium parvum

Annita® é também indicado no tratamento do Blastocystis hominis, Balantidium coli e Isospora belli

Quando não devo usar este medicamento? Contra-indicações Annita® não deve ser administrado nas situações a seguir: • A forma farmacêutica comprimido revestido é contra-indicada para crianças com onze anos ou mais jovens. • Annita® não deve ser utilizado por pacientes com diabetes, doença hepática ou doença renal. • Hipersensibilidade e/ou alergia a qualquer um dos componentes da fórmula.

#### Advertências

As seguintes medidas de higiene são recomendadas no combate às parasitoses • Lavar bem as frutas e verduras e cozinhá-las bem. • Lavar bem os utensílios domésticos. • Manter os alimentos e depósitos de água cobertos. • Manter as mãos sempre limpas e as unhas cortadas, evitar levá-las a boca e lavá-las antes das refeições e após ir ao banheiro. • Utilizar água tratada, filtrada ou fervida e não beber água em recipientes impróprios. • Manter local adequado para depósito de fezes humanas ou de animais (fossas e latrinas), evacuar em local apropriado (vaso sanitário) e manter as instalações sanitárias limpas. • Não utilizar fezes humanas como adubo. • Não comer carne suína e/ou bovina crua ou mal cozida. • Não adquirir carne de procedência duvidosa (comprar em estabelecimentos comerciais idôneos, que recebem carnes de criadouros ou frigoríficos regularizados e inspecionados periodicamente). • Não andar com os pés descalços

Precauções O uso de Annita® com anticoagulantes do tipo cumarínicos como a varfarina e com o anticonvulsivante fenitoína deve ser avaliado com cautela.

Interações medicamentosas Não existem interações com o citocromo CYP 450, não havendo, portanto, contraindicação de uso concomitante com outros medicamentos. Observar o item Precauções em relação à administração com anticoagulantes e anticonvulsivantes.

Atenção: este medicamento contém açúcar, portanto, deve ser usado com cautela em portadores de diabetes. Informe seu médico do aparecimento de reações indesejáveis. Informe seu médico se você está fazendo uso de algum outro medicamento. Não use medicamento sem o conhecimento de seu médico. Pode ser perigoso para a sua saúde.

Como devo usar este medicamento? Annita® deve ser administrado com alimentos, o que garante uma elevada absorção do medicamento. Aspecto físico Comprimidos: oblongos, de cor amarelo-claro Pó para suspensão oral: cristalino, amarelo

Características organolépticas Comprimidos: odor característico Pó para suspensão oral: odor ligeiramente ácido.

Posologia Suspensão oral Indicação Idade Dosagem Duração Gastroenterites virais causadas por Rotavírus e Norovírus Crianças acima de 12 meses (1 ano) 0,375 ml (7,5 mg) por Kg - 2 vezes por dia (a cada 12 horas) 3 dias consecutivos Helminthíases, amebíase, giardíase, isosporíase, balantidíase, blastocistose. Crianças acima de 12 meses (1 ano) 0,375 ml (7,5 mg) por kg, 2 vezes por dia (a cada 12 horas) 3 dias consecutivos Criptosporidíase em pacientes sem imunodepressão. Crianças acima de 12 meses (1 ano) 0,375 ml (7,5 mg) por kg, 2 vezes por dia (a cada 12 horas) 3 dias consecutivos Criptosporidíase em pacientes imunodeprimidos, se a contagem de CD4 for superior a 50 céls/mm<sup>3</sup>. Crianças acima de 12 meses (1 ano) 7,5 mg por kg, 2 vezes por dia (a cada 12 horas) 14 dias consecutivos Criptosporidíase em pacientes imunodeprimidos, se a contagem de CD4 for inferior a 50 céls/mm<sup>3</sup>. Crianças acima de 12 meses (1 ano) 7,5 mg por kg, 2 vezes por dia (a cada 12 horas) Deve-se manter a medicação por, no mínimo, 8 semanas ou até a resolução dos sintomas e negatização dos oocistos.

Comprimido revestido Indicação Idade Dosagem Duração Gastroenterites virais causadas por Rotavírus e Norovírus Crianças acima de 12 anos e adultos 1 comprimido (500 mg), 2 vezes ao dia (a cada 12 horas) 3 dias consecutivos Helminthíases, amebíase, giardíase, isosporíase, balantidíase, blastocistose

Crianças acima de 12 anos e adultos

1 comprimido (500 mg), 2 vezes por dia (a cada 12 horas)

3 dias consecutivos

Criptosporidíase em pacientes sem imunodepressão.

Crianças acima de 12 anos e adultos

1 comprimido (500 mg), 2 vezes por dia (a cada 12 horas)

3 dias consecutivos

Criptosporidíase em pacientes imunodeprimidos, se a contagem de CD4 for superior a 50 céls/mm<sup>3</sup>.

Crianças acima de 12 anos e adultos

500 a 1000 mg, 2 vezes por dia (a cada 12 horas)

14 dias consecutivos

Criptosporidíase em pacientes imunodeprimidos, se a contagem de CD4 for inferior a 50 céls/mm<sup>3</sup>.

Crianças acima de 12 anos e adultos

500 a 1000 mg, 2 vezes por dia (a cada 12 horas)

Deve-se manter a medicação por, no mínimo, 8 semanas ou até a resolução dos sintomas e negatificação dos oocistos.

Modo de preparo Suspensão oral Prepare a suspensão imediatamente antes de ingeri-la pela primeira vez, conforme instrução abaixo:

1 – Agite vigorosamente o frasco ainda fechado, para soltar o pó do fundo.

2 – Adicione água fervida ou filtrada, até a marcação indicada no rótulo.

3 – Coloque o adaptador para seringa no frasco.

4 – Tampe o frasco e agite vigorosamente para obtenção de uma suspensão homogênea. Se necessário, adicione novamente água filtrada, até a marcação indicada no rótulo e agite para homogeneizar.

5 – O volume da suspensão deve ser medido com a seringa. Ajuste a seringa no orifício da tampa interna do frasco, vire-o de cabeça para baixo e puxe o êmbolo até o volume prescrito por seu médico.

6 – A suspensão pode ser administrada diretamente da seringa à boca ou, se desejado, pode ser transferida para a colher antes da administração.

Após o uso, lave a seringa em água corrente e guarde-a para a próxima dosagem. A suspensão pode ser guardada por 7 dias após seu preparo. Qualquer quantidade não utilizada deve ser descartada após esse período. Antes de cada administração a suspensão deve ser bem agitada.

Este medicamento não pode ser partido ou mastigado. Siga a orientação de seu médico, respeitando sempre os horários, as doses e a duração do tratamento. Não interrompa o tratamento sem o conhecimento de seu médico. Não use o medicamento com o prazo de validade vencido. Antes de usar, observe o aspecto do medicamento.

Que males este medicamento pode causar? As reações adversas mais comumente relatadas (em cerca de 8% dos pacientes) ocorrem no trato gastrointestinal. Particularmente náuseas, algumas vezes

acompanhadas de dor de cabeça, diminuição ou perda do apetite, ocasionalmente vômitos, mal estar abdominal inespecífico e dor abdominal tipo cólica. Annita® pode produzir alteração da cor dos fluidos fisiológicos (Ex: urina, esperma) para amarelo esverdeado, sem qualquer significado clínico. Isto se deve à coloração de alguns dos componentes da fórmula. Se a cor alterada persistir após o término do uso do medicamento, procure o médico.

**ATENÇÃO: ESTE É UM MEDICAMENTO NOVO E, EMBORA AS PESQUISAS TENHAM INDICADO EFICÁCIA E SEGURANÇA ACEITÁVEIS PARA COMERCIALIZAÇÃO, EFEITOS INDESEJÁVEIS E NÃO CONHECIDOS PODEM OCORRER. NESTE CASO, INFORME SEU MÉDICO.**

O que fazer se alguém usar uma grande quantidade deste medicamento de uma só vez? As manifestações são locais, no aparelho digestivo. Recomenda-se proceder com lavagem gástrica e administrar hidróxido de alumínio com magnésio.

Onde e como devo guardar este medicamento? Cuidados de conservação Annita® deve ser conservado em sua embalagem original. Em temperatura ambiente (entre

15°C e 30°C) e lugar seco. Após reconstituição, a suspensão oral deve ser mantida firmemente fechada.

Prazo de validade Comprimido revestido 24 meses após a data de fabricação impressa no cartucho. Pó para suspensão oral 24 meses após a data de fabricação impressa no cartucho.

Annita®, suspensão oral, deve ser consumido em até sete dias após reconstituição.

**TODO MEDICAMENTO DEVE SER MANTIDO FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS**

### INFORMAÇÕES TÉCNICAS AOS PROFISSIONAIS DE SAÚDE

**Características farmacológicas** Farmacodinâmica Após administração oral em humanos, a nitazoxanida é rapidamente hidrolisada em seu metabólito ativo, a tizoxanida (diacetil-nitazoxanida). A nitazoxanida e seu metabólito são facilmente reduzidos pela enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductase a partir de parasitas por transferência de elétrons. Esta forma reduzida da nitazoxanida priva os parasitas de suas energias e assim os erradica. Sabe-se que um dos mecanismos de ação da nitazoxanida é a ação inibitória direta da enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR). A ação sobre vírus deve-se à inibição da síntese da estrutura viral chamada de proteína 7 em sua interação com a célula, bloqueando a habilidade do vírus em se multiplicar. É possível que outros mecanismos ainda não esclarecidos sejam responsáveis por sua ação sobre vírus. O modo de ação da nitazoxanida contra os helmintos ocorre através da inibição da polimerização da tubulina no parasita. A atividade antiprotozoária de Annita® (nitazoxanida) deve-se à interferência na enzima piruvato-ferredoxinaoxidoreductase (PFOR), bloqueando a transferência de elétrons. Este mecanismo de ação é muito peculiar e dificulta o desenvolvimento de resistência. A interferência com a reação de transferência de elétrons enzima piruvatoferredoxina-oxidoreductase dependente pode não ser a única via pela qual a nitazoxanida exibe a atividade anti-protozoária.

**Farmacocinética** Após a administração oral, a nitazoxanida é rapidamente absorvida no trato intestinal e totalmente hidrolizada em um metabólito ativo, a tizoxanida, que é então conjugada (glucoronídeo tizoxanida), atingindo picos de concentração plasmática em 1 a 4 horas. A tizoxanida é excretada de forma inalterada pela urina



nas 24 horas seguintes, e não é detectada no plasma. A excreção também ocorre através da bile e das fezes. Mais de 99% da tizoxanida estão ligados a proteínas plasmáticas.

Estudos *in vitro* demonstraram que a tizoxanida não possui efeito inibitório significativo sobre as enzimas do citocromo P450. A farmacocinética da nitazoxanida não foi estudada em pacientes pediátricos menores que um ano de idade, assim como em pacientes com deficiência hepática e ou função renal.

Resultados de eficácia Um estudo<sup>1</sup> multicêntrico aberto incluiu 546 pacientes com coproscopia positiva para as mais variadas parasitoses intestinais. As doses de nitazoxanida utilizadas foram: 500 mg, por via oral, duas vezes ao dia, por três dias consecutivos para adultos; 5ml (100 mg), de 12 em 12 horas para crianças de um a três anos e 10 ml (200 mg), de 12 em 12 horas, para crianças de quatro a 11 anos. As taxas de erradicação foram: *Enterobius vermicularis* - 95%, *Ascaris lumbricoides* - 95%, *Ancylostoma duodenale* - 96%, *Trichuris trichiura* - 86% e *Strongyloides stercoralis* - 94%. A tolerabilidade foi considerada boa, com 14,5% de eventos adversos leves (náuseas, cefaléia, vertigem, vômito, dor abdominal e diarreia). Cabello et al.<sup>2</sup> avaliaram a eficácia da nitazoxanida no tratamento de infestações helmínticas (7,5 mg/kg, de 12 em 12 horas, por três dias) e observou taxas de cura de até 100% para ascaridíase e isosporíase e de 78% e 80% para trichuríase e enterobíase, respectivamente. Um estudo de Rossignol & Maisonneuve<sup>3</sup> avaliou a eficácia da nitazoxanida em pacientes portadores de *Taenia saginata* e *Hymenolepis nana*. Foram estudados 22 pacientes infestados com *T.saginata*, que receberam 30mg/kg de nitazoxanida. Os autores encontraram um índice de cura de 95% com seguimento clínico por um período de 90 dias. Ainda neste estudo, em 18 pacientes infestados por *H.nana*, a eficácia foi de 90%, para a dose de 50 mg/kg de nitazoxanida. A tolerabilidade foi considerada boa, com apenas três pacientes apresentando eventos adversos leves (náusea, dor epigástrica e diarreia). Rossignol et al<sup>4</sup> demonstraram a eficácia da nitazoxanida para o tratamento da diarreia causada por *C parvum* em uma população imunocompetente. Um curso de três dias de tratamento reduziu a duração da diarreia e da excreção de oocistos. A eficácia e a segurança foram relatadas em crianças, adolescentes e adultos. Os eventos adversos relatados foram semelhantes àqueles do grupo placebo.

Em um estudo<sup>5</sup> multicêntrico, Rossignol avaliou a eficácia e a segurança da nitazoxanida em 365 pacientes a partir de três anos de idade com síndrome de imunodeficiência adquirida e criptosporidíase, que receberam doses de 500 a 1500 mg de nitazoxanida, duas vezes por dia. A duração do tratamento foi, em média, de 62 dias. Observou-se resposta clínica mantida durante o tratamento em 59% dos casos. Não foram registrados eventos adversos graves. Em outro estudo<sup>6</sup> prospectivo, randomizado, duplo-cego e placebo controlado, foi avaliada a eficácia e a tolerabilidade da nitazoxanida comparada ao placebo para tratar diarreias causadas por *Giardia intestinalis* e *Entamoeba histolytica/dispar*. Foram analisadas 725 amostras de fezes, de 91 pacientes entre 12 e 65 anos, que fizeram uso da nitazoxanida na dose de 500 mg, de 12 em 12 horas, por três dias consecutivos. Observou-se uma eficácia geral de 81% contra 40% do grupo placebo para ambas as verminoses ( $p < 0,0002$ ). Um estudo<sup>7</sup> conduzido por Diaz et al. revelou taxa de cura de 97% para os pacientes portadores de blastocistose em crianças de dois a 14 anos de idade. Em uma coorte<sup>1</sup> de pacientes no Egito foi identificada a presença de *Balantidium coli* nas fezes em 13 casos, cuja erradicação da infecção foi de 77%. Em estudo randomizado<sup>8</sup>, duplo-cego, controlado por placebo, envolvendo 50 crianças com idade entre cinco meses e sete anos, Rossignol et al avaliaram a eficácia e segurança da nitazoxanida na gastroenterite por Rotavírus. A dose de 7,5 mg/kg, duas vezes ao dia por três dias mostrou-se segura e mais eficaz que o placebo na redução da duração da diarreia (31h vs 75h, respectivamente). Em outro estudo randomizado<sup>9</sup>, duplo-cego, controlado por placebo, envolvendo 50 adultos e crianças acima de 12 anos, Rossignol & El-Gohary avaliaram a eficácia e segurança da nitazoxanida nas gastroenterites virais, incluindo as causadas por Rotavírus e Norovírus. A dose de 500 mg, duas vezes ao dia por três dias mostrou-se segura e mais eficaz que o placebo na redução da duração da diarreia.

1 Abaza H. et al. Nitazoxanide in the treatment of patients with intestinal protozoan and helminthic infections: a report on 546 patients in Egypt. *Curr. Ther. Res.* 59:116–121, 1998. 2 Cabello R R. et al. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91:701–703, 1997. 3 Rossignol JF; Maisonneuve H. Nitazoxanide in the treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana*. *Am J Trop Med Hyg*; 33: 511-512, 1984.

4 Rossignol JF; Ayoub A; Ayers MS. Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J Infect Dis*; 184: 103-106, 2001. 5 Rossignol JF. Nitazoxanide in the treatment of acquired immune deficiency syndrome-related cryptosporidiosis: results of the United States compassionate use program in 365 patients. *Aliment Pharmacol Ther*; 24:887-894, 2006. 6 Rossignol JF; Ayoub A; Ayers MS. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J Infect Dis*; 184: 381-384, 2001. 7 Diaz E; Mondragon J; Ramirez E; Bernal R. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in México. *Am J Trop Med Hyg*; 68:384-385, 2003. 8 Rossignol JF et al. Effect of nitazoxanide for treatment of severe Rotavirus diarrhoea: randomised double-blind placebo-controlled trial. *The Lancet*; 368:124-129, 2006. 9 Rossignol JF; El-Gohary YM. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aliment Pharmacol Ther*; 24:1423–1430, 2006.

Indicações Gastroenterites virais - Annita® é indicado no tratamento das gastroenterites virais causadas por Rotavírus e Norovírus.

Helmintíases – Annita® é um anti-helmíntico efetivo contra nematódeos, cestódeos e trematódeos, indicado no tratamento de *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, Ancilostomíase, *Trichuris trichiura*, *Taenia sp*, *Hymenolepis nana*.

Amebíases – Annita® é indicado no tratamento da diarreia causada por amebíases intestinais agudas ou disenteria amebiana causada pelo complexo *Entamoeba histolytica/dispar*.

Giardiases - Annita® é indicado no tratamento da diarreia causada por *Giardia lamblia* ou *Giardia intestinalis*.

Criptosporidíase – Annita® é indicado no tratamento da diarreia causada por *Cryptosporidium parvum*

Annita® é também indicado no tratamento do *Blastocystis hominis*, *Balantidium coli* e *Isospora belli*

Contra-indicações • A forma farmacêutica comprimido revestido não deve ser administrada em crianças de zero a 11 anos. • Diabetes, doença hepática ou doença

renal. • Pacientes com história de hipersensibilidade e/ou alergia à nitazoxanida ou aos componentes da fórmula.

Modo de usar e cuidados de conservação depois de aberto Annita® deve ser administrado com alimentos, o que garante uma elevada absorção do medicamento.

Modo de preparo Prepare a suspensão imediatamente antes de ingeri-la pela primeira vez, conforme instrução abaixo:

- 1 – Agite vigorosamente o frasco ainda fechado, para soltar o pó do fundo.
- 2 – Adicione água fervida ou filtrada, até a marcação indicada no rótulo.
- 3 – Coloque o adaptador para seringa no frasco.
- 4 – Tampe o frasco e agite vigorosamente para obtenção de uma suspensão homogênea. Se necessário, adicione novamente água filtrada, até a marcação indicada no rótulo e agite para homogeneizar.
- 5 – O volume da suspensão deve ser medido com a seringa. Ajuste a seringa no orifício da tampa interna do frasco, vire-o de cabeça para baixo e puxe o êmbolo até o volume prescrito por seu médico.
- 6 – A suspensão pode ser administrada diretamente da seringa à boca ou, se desejado, pode ser transferida para a colher antes da administração.

Após o uso, a seringa deve ser lavada com água corrente e guardada para a próxima dosagem. A suspensão pode ser guardada por sete dias após seu preparo. Qualquer quantidade não utilizada deve ser descartada após esse período. Antes de cada administração a suspensão deve ser bem agitada.

Aspecto físico Comprimidos: oblongos, de cor amarelo-claro Pó para suspensão oral: cristalino, amarelo

Características organolépticas Comprimidos: odor característico Pó para suspensão oral: odor ligeiramente ácido.

Posologia Suspensão oral Indicação Idade Dosagem Duração Gastroenterites virais causadas por Rotavírus e Norovírus Crianças acima de 12 meses (1 ano) 0,375 ml (7,5 mg) por Kg - 2 vezes por dia (a cada 12 horas) 3 dias consecutivos Helmintíases, amebíase, giardíase, isosporíase, balantidíase, blastocistose. Crianças acima de 12 meses (1 ano) 0,375 ml (7,5 mg) por kg, 2 vezes por dia (a cada 12 horas) 3 dias

consecutivos Criptosporidíase em pacientes sem imunodepressão. Crianças acima de 12 meses (1 ano) 0,375 ml (7,5 mg) por kg, 2 vezes por dia (a cada 12 horas) 3 dias consecutivos Criptosporidíase em pacientes imunodeprimidos, se a contagem de CD4 for superior a 50 céls/mm<sup>3</sup>. Crianças acima de 12 meses (1 ano) 7,5 mg por kg, 2 vezes por dia (a cada 12 horas) 14 dias consecutivos Criptosporidíase em pacientes imunodeprimidos, Crianças acima de 12 meses (1 7,5 mg por kg, 2 vezes por dia (a deve-se manter a medicação

se a contagem de CD4 for inferior a 50 céls/mm<sup>3</sup>.

ano) cada 12 horas) por, no mínimo, 8 semanas ou até a resolução dos sintomas e negatificação dos oocistos

Comprimido revestido Indicação Idade Dosagem Duração Gastroenterites virais causadas por Rotavírus e Norovírus. Crianças acima de 12 anos e adultos 1 comprimido (500 mg), 2 vezes ao dia (a cada 12 horas) 3 dias consecutivos

Helmintíases, amebíase, giardíase, isosporíase, balantidíase, blastocistose. Crianças acima de 12 anos e adultos

1 comprimido (500 mg), 2 vezes por dia (a cada 12 horas)

3 dias consecutivos

Criptosporidíase em pacientes sem imunodepressão. Crianças acima de 12 anos e adultos

1 comprimido (500 mg), 2 vezes por dia (a cada 12 horas)

3 dias consecutivos

Criptosporidíase em pacientes imunodeprimidos, se a contagem de CD4 for superior a 50 céls/mm<sup>3</sup>.

Crianças acima de 12 anos e adultos

500 a 1000 mg, 2 vezes por dia (a cada 12 horas)

14 dias consecutivos

Criptosporidíase em pacientes imunodeprimidos, se a contagem de CD4 for inferior a 50 céls/mm<sup>3</sup>.

Crianças acima de 12 anos e adultos

500 a 1000 mg, 2 vezes por dia (a cada 12 horas)

Deve-se manter a medicação por, no mínimo, 8 semanas ou até a resolução dos sintomas e negativação dos oocistos.

#### Advertências

• O uso de Annita® com anticoagulantes do tipo cumarínicos como a varfarina e com o anticonvulsivante fenitoína deve ser avaliado com cautela. • Annita® pode produzir alteração da cor dos fluidos fisiológicos (ex: urina, esperma) para amarelo esverdeado, sem qualquer significado clínico. Isto se deve à coloração de alguns dos componentes da fórmula. Se a cor alterada persistir após o término do uso do medicamento, procure o médico.

Atenção: este medicamento contém açúcar, portanto, deve ser usado com cautela em portadores de diabetes.

Uso em idosos, crianças e outros grupos de risco Não há estudos com pacientes acima de 65 anos. Ao se prescrever Annita® deve-se considerar a capacidade renal, hepática e cardíaca, a presença de outras doenças e a utilização concomitante de outras drogas.

Interações medicamentosas O uso de Annita® com anticoagulantes cumarínicos como a varfarina e com o anticonvulsivante fenitoína deve ser avaliado com cautela. Não existem interações com o citocromo CYP 450, não havendo, portanto, contraindicação de uso concomitante com outros medicamentos.

Reações adversas Gastrointestinal Muito comum: mal estar abdominal inespecífico e dor abdominal tipo cólica. Incomum: vômitos e diarreia Rara: constipação, flatulência e náuseas, dispepsia

Glandular Comum: Hiperidrose

Nervoso Incomum: cefaléia Rara: insônia, desmaios, tremores

Metabólico/Nutricional Muito comum: alterações de apetite (diminuição ou perda) Rara: aumento do apetite

Imunológico Rara: aumento do apetite

Reprodutor Rara: metrorragia, amenorréia

Geral Rara: dor nas costas, cãimbra nas pernas, mialgia, dor de ouvido, febre, calafrios

Renal e urinário Rara: doença renal, disúria, descoloração da urina

Cardiovascular Rara: hipertensão, taquicardia

Dermatológico Rara: prurido da pele e rash cutâneo

**ATENÇÃO: ESTE É UM MEDICAMENTO NOVO E, EMBORA AS PESQUISAS TENHAM INDICADO EFICÁCIA E SEGURANÇA ACEITÁVEIS PARA COMERCIALIZAÇÃO, EFEITOS INDESEJÁVEIS E NÃO CONHECIDOS PODEM OCORRER. NESTE CASO, INFORME SEU MÉDICO.**

Superdosagem As manifestações são locais, no aparelho digestivo. Pode-se proceder à lavagem gástrica e administrar hidróxido de alumínio com magnésio.

Armazenagem Annita® deve ser conservado em temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C), em sua embalagem original. Proteger da umidade.

Após reconstituição, a suspensão oral deve ser mantida firmemente fechada. Annita®, suspensão oral, deve ser consumido em até sete dias após reconstituição.

Após reconstituição, a suspensão oral deve ser mantida firmemente fechada.

#### VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA

Número do lote, data de fabricação e prazo de validade: vide cartucho MS: 1.0390.0173 Farm. Resp.: Dra. Marcia Weiss I. Campos – CRF-RJ nº 4499 Fabricado por: FARMOQUIMICA S/A Rua Viúva Claudio nº 300 – Rio de Janeiro – RJ Indústria Brasileira CNPJ: 33.349.473/0003-10 SAC 0800 25 01 10