UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Naiara de Assis Rabelo Ribeiro

INFECÇÃO AGUDA POR ZIKA VÍRUS: impacto na função cardíaca e no tônus vascular - papel do eixo CCR5–COX–PGI_2-PKA

Belo Horizonte

2025

Naiara de Assis Rabelo Ribeiro

INFECÇÃO AGUDA POR ZIKA VÍRUS: impacto na função cardíaca e no tônus vascular - papel do eixo CCR5–COX–PGI_2-PKA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Bonaventura.

Belo Horizonte

2025

043 Ribeiro, Naiara de Assis Rabelo.
Infecção aguda por Zika Vírus: impacto na função cardíaca e no tônus vascular - papel do eixo CCR5–COX–PGI2-PKA [manuscrito] / Naiara de Assis Rabelo Ribeiro. – 2025.
138 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Bonaventura.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Zika virus. 3. Sistema Cardiovascular. 4. Quimiocina CCL5. 5. Proteínas Quinases Dependentes de AMP Cíclico. I. Bonaventura, Daniella. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Fabiane C M Reis, CRB 6 - 2680

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO

N° 401 DE NAIARA DE ASSIS RABELO RIBEIRO

Às 08:30 horas do dia 14 do mês de julho de 2025, Transmitida através da Plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Naiara de Assis Rabelo Ribeiro.** A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Daniella Bonaventura,** orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Daniella Bonaventura,** ICB/UFMG, **Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau,** ICB/UFMG, **Profa. Dra. Alice Valença Araújo,** CAV/UFPE, **Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni,** ICB/USP e **Prof. Dr. Rafael Menezes da Costa,** ICS/UFJ. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"Infecção Aguda por Zika Vírus: Impacto na Função Cardíaca e no Tônus Vascular - Papel do Eixo CCR5-COX-PGI2-PKA".** Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 14 de julho de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Documento assinado eletronicamente por **Luciana Venturini Rossoni**, **Usuário Externo**, em 05/08/2025, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Stefany Bruno de Assis Cau**, **Professor do Magistério Superior**, em 05/08/2025, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura**, **Professora do Magistério Superior**, em 06/08/2025, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Alice Valença Araújo**, **Usuário Externo**, em 06/08/2025, às 20:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Rafael Menezes da Costa**, **Usuário Externo**, em 11/08/2025, às 13:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4432624** e o código CRC **BC6D8E64**.

Dedico a tese desenvolvida no doutorado aos meus pais, avós, ao meu irmão, ao meu esposo e à Nini. Sem vocês, sem o apoio que me deram, esse lindo trabalho não seria possível. Serei eternamente grata!

Agradecimentos

Nesse momento, passa em minha mente um verdadeiro filme de toda essa jornada. Em primeiro lugar, agradeço a Deus e aos meus guias espirituais por me auxiliarem na realização do doutorado, por me ajudarem a me manter firme diante dos meus desejos e objetivos, por não permitirem que eu perdesse a razão, o foco, o brilho e a fé.

Agradeço à minha família, especialmente ao meu esposo Vini, por viver o doutorado comigo, por compartilhar as alegrias e o sucesso de um experimento bem-sucedido, assim como as tristezas quando algo não ocorreu como esperado, as angústias e os medos, tudo ao meu lado. Por comemorarmos juntos as menções honrosas e as conquistas. Seria absurdamente difícil sem você, Amor. Amo você!

Aos meus pais e ao meu irmão, pela imensa dedicação a mim e ao meu sonho: obrigada por fortalecerem minha saúde física e mental, por me auxiliarem no que podiam – e não apenas durante o doutorado, mas ao longo de toda a vida. Agradeço pela formação humana e profissional que me proporcionaram, pelos recursos financeiros, pelas alegrias nas comemorações, pelas orações e pelo desejo constante de que tudo corresse bem – e correu! Sou eternamente grata a vocês. Seria impossível sem vocês. Amo vocês!

À minha filha de quatro patas, Nini: meu amor, minha gratidão por me apoiar e me amar incondicionalmente. Seu olhar sempre me acalmou e me faz feliz todos os dias. Te amo, Nini.

À toda a minha grande família – tios, tias, primos, primas, afilhados, avôs (in memoriam), que se tornaram meus guias espirituais, e avós, especialmente a Vovó Zezé, por sua torcida, suas orações e seu amor. Amo muito todos vocês!

Aos meus amigos pessoais de uma vida inteira, agradeço pelo incentivo e pela torcida constante. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui. Obrigada! Amo vocês!

Agradeço também à minha chefe – no papel – mas, no coração, minha mãe científica. Dani, obrigada por tornar essa caminhada mais leve, pelos ensinamentos, pela atenção e carinho, pelos nove anos juntas e pela parceria maravilhosa que tivemos. Sou eternamente grata a você. E não poderia deixar de agradecer ao Fred,

pelas discussões, pelo apoio científico e financeiro. Dani e Fred, vocês são grandes cientistas e uma inspiração para mim.

Agradeço imensamente aos meus amigos do LFV: às antigas, mas sempre presentes, Little, Dani Loira, Nati Nóbrega e Belinha; e aos novos (Jaque, Marinete e Richard). Preciso incluir também a extensão do nosso laboratório: meu amigo Ivan. Amigos, amo vocês e agradeço por nossa amizade. Obrigada pela parceria, por dividirem comigo a dor e a delícia da pós-graduação. Nossos dias são mais divertidos e leves quando estamos juntos.

Aos meus amigos da pós-graduação, que tornam a jornada mais rica, cheia de conhecimento e boas risadas, meu muito obrigada! À minha amiga Little, por ser mais que uma colega de laboratório, ser minha madrinha, minha companheira. Obrigada pelas boas risadas, pelo auxílio em tudo o que eu precisei na vida profissional e pessoal. Por estar sempre ao meu lado, mesmo à quilômetros de distância.

Agradeço profundamente a todos os colaboradores deste trabalho por contribuírem para a realização de algo tão completo e relevante para a comunidade científica e para a população. Obrigada por agregarem conhecimento técnico-científico, pelas horas de cuidado e dedicação, pelas palavras de incentivo e pela qualidade do material produzido.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, agradeço pelo aprendizado e pela colaboração. Também agradeço aos funcionários do programa e do ICB por todo o suporte. Em especial, destaco o Rinaldo, por todo o seu trabalho e alegria, e à Cida, pelo cuidado com o nosso ambiente.

Aos membros da banca, meu sincero agradecimento pela dedicação, pelo conhecimento compartilhado e pela disponibilidade em participar. Vocês foram escolhidos a dedo, e estou imensamente feliz por estarem comigo neste momento tão especial e por contribuírem com minha formação.

Agradeço imensamente à professora Vivian Costa e ao seu laboratório. Vivi, muito obrigada pelo apoio prático por meio de insumos que possibilitou a realização deste trabalho.

Aproveito também para agradecer aos animais de experimentação – pela vida, por contribuírem com a ciência e com a sociedade. Meu profundo respeito e gratidão.

Agradeço às agências de fomento pelo apoio financeiro, à UFMG – universidade pública e de qualidade – e a todos os envolvidos!

A ciência é um investimento para o nosso país. Pesquisadores são profissionais e merecem o devido reconhecimento. Viva a ciência!

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original."

— Albert Einstein

Resumo

A infecção pelo ZIKV causa complicações neurológicas significativas, porém os impactos cardiovasculares permanecem pouco explorados. O objetivo deste estudo foi avaliar alterações cardiovasculares e seus mecanismos em camundongos infectados pelo ZIKV. Para tanto, utilizou-se camundongos A129 (IFNα/βR$^{-/-}$), que foram divididos em controle (MOCK) e infectados (4x10³ PFU, i.v.). Os resultados foram obtidos em 3 e 5 dias após-infecção (dpi), incluindo escore clínico, massa corporal, hemograma, título viral, mediadores pró-inflamatórios, permeabilidade vascular, função renal, pressão arterial sistólica (PAS), eletrocardiograma, dosagem de CK-MB, função e contratilidade cardíaca, transiente de cálcio e reatividade vascular. Na infecção congênita, fêmeas grávidas da linhagem C57Bl/6J, foram infectadas (1×10⁶ PFU, via i.p.) no 5º dia de gestação e a reatividade vascular da prole foi avaliada na 12ª semana de vida. Foram considerados significativos os resultados com $p<0,05$. Os resultados demonstraram que a infecção por ZIKV reduziu a massa corporal em 3 e 5 dpi e causou redução da pressão arterial em 3 dpi. Além disso, os camundongos infectados apresentaram inflamação sistêmica, leucocitose e esplenomegalia. O ZIKV foi detectado no plasma, coração e aorta em 3 e 5 dpi, com elevação de CCL5 e CCL2 na aorta e de CCL5 no plasma. A infecção pelo ZIKV causou prejuízo da função renal e aumento de células tubulares e intersticiais. O eletrocardiograma revelou bloqueio de condução cardíaca em 5 dpi, com prolongamento da onda P, intervalo PR e QT. A contratilidade cardíaca aumentou, refletida por elevação de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), derivada da pressão em função do tempo – positiva e negativa (dP/dT), fração de encurtamento dos cardiomiócitos, além do transiente de cálcio. A hipercontratilidade cardíaca observada pode representar um estágio precoce de disfunção miocárdica compensatória, que pode ser transitória, possivelmente induzida pela ativação do eixo CCR5–COX–prostaciclina–PKA, capaz de promover sobrecarga de cálcio no citoplasma por um prejuízo na ação de SERCA/Fosfolambam. Em aortas, a infecção resultou em hiporreatividade à fenilefrina (5 dpi), revertida pelo antagonismo do receptor de CCL5 (CC5R - Maraviroc). Inibidores seletivos de COX-1 e COX-2 (Mofezolac e Celecoxib, respectivamente), antagonista do receptor para prostaciclina (RO1138452) e inibidor da proteína quinase A (PKA) (KT-5720) também reverteram a hiporreatividade vascular. Sugere-se que a inflamação vascular e a

hiporresponsividade à fenilefrina foi mediada pela via CCR5–COX–prostaciclina–PKA, cuja intervenção farmacológica reverteu a disfunção vascular. A infecção por ZIKV não impactou a reatividade vascular aórtica nas fêmeas adultas, indicando uma proteção hormonal. Já na infecção congênita, observou-se hiperresponsividade à fenilefrina na prole, indicando possível envolvimento de mecanismos distintos, como o estresse oxidativo via produção de ânion superóxido. Os resultados sugerem que a ativação do eixo inflamatório CCR5–COX–prostaciclina–PKA pode impactar não apenas o tônus vascular, mas também a função elétrica e contrátil do coração durante a fase aguda da infecção. Dessa forma, o presente trabalho contribui para esclarecer os mecanismos patogênicos ainda pouco explorados na infecção pelo ZIKV, destacando o impacto desta infecção no sistema cardiovascular.

Palavras-chave: Zika Vírus. Reatividade Vascular Aórtica. Sistema Cardiovascular. CCL5. PKA.

Abstract

ZIKV infection causes significant neurological complications; however, its cardiovascular impacts remain poorly explored. This study aimed to evaluate cardiovascular changes and their mechanisms in mice infected with ZIKV. A129 mice (IFNα/βR$^{-/-}$) were used and divided into control (MOCK) and infected groups (4×10^3 PFU, intravenous). Data were collected at 3- and 5-days post-infection (dpi), including clinical score, body mass, blood count, viral load, pro-inflammatory mediators, vascular permeability, renal function, systolic blood pressure (SBP), electrocardiogram, CK-MB levels, cardiac function and contractility, calcium transients, and vascular reactivity. In congenital infection, pregnant females of the C57Bl/6J lineage were infected (1×10^6 PFU, via i.p.) on the 5th day of gestation and the vascular reactivity of the offspring was evaluated at the 12th week of life. Results with $p<0.05$ were considered statistically significant.

The results demonstrated that ZIKV infection reduced body mass at 3 and 5 dpi and caused a decrease in blood pressure at 3 dpi. Additionally, infected mice exhibited systemic inflammation, leukocytosis, and splenomegaly. ZIKV was detected in the plasma, heart, and aorta at 3 and 5 dpi, with increased levels of CCL5 and CCL2 in the aorta and CCL5 in the plasma. ZIKV infection caused impaired renal function and an increase in tubular and interstitial cells. The electrocardiogram revealed cardiac conduction block at 5 dpi, with prolonged P wave, PR and QT interval. Cardiac contractility was enhanced, reflected by increased left ventricular developed pressure (LVDP), positive and negative pressure derivative (dP/dT), cardiomyocyte fractional shortening, and calcium transients. The observed cardiac hypercontractility may represent an early stage of compensatory myocardial dysfunction, potentially transient, possibly induced by activation of the CCR5–COX–prostacyclin–PKA axis, which can promote calcium overload in the cytoplasm due to impaired SERCA/phospholamban function.

In mice aorta, the infection resulted in hyporeactivity to phenylephrine (5 dpi), which was reversed by CCL5 receptor antagonism (CCR5 - Maraviroc). COX-1 and COX-2 inhibitors (Mofezolac and Celecoxib, respectively), a prostacyclin receptor antagonist (RO1138452), and a protein kinase A (PKA) inhibitor (KT-5720) also reversed the vascular hyporeactivity. It is suggested that vascular inflammation and hyporesponsiveness to phenylephrine were mediated by the CCR5–COX–

prostacyclin–PKA pathway, and pharmacological intervention reversed this vascular dysfunction.

ZIKV infection did not impact vascular reactivity in adult females, suggesting hormonal protection. However, in congenital infection, offspring exhibited hyperresponsiveness to phenylephrine, indicating the possible involvement of distinct mechanisms such as oxidative stress via superoxide anion production. The results suggest that activation of the CCR5–COX–prostacyclin–PKA inflammatory and endothelial axis may impact not only vascular tone but also cardiac electrical and contractile function during the acute phase of infection. Thus, this study contributes to clarifying the still poorly explored pathogenic mechanisms of ZIKV infection, highlighting its impact on the cardiovascular system.

Keywords: Zika Virus. Aortic Vascular Reactivity. Cardiovascular System. CCL5. PKA.

Lista de figuras

Número da figura	Título	Página
Figura 1	Casos prováveis de infecção por ZIKV em 2024.	27
Figura 2	Casos notificados/confirmados de infecção por ZIKV em 2024.	29
Figura 3	Microscopia crioeletrônica (Cryo-EM map) analisou a estrutura tridimensional dos vírus Zika, dengue e oeste do Nilo.	31
Figura 4	Ciclo de replicação do ZIKV.	32
Figura 5	Caracterização do estado clínico dos animais infectados ou não por ZIKV.	58
Figura 6	Efeito da infecção por ZIKV sobre os parâmetros sanguíneos e inflamatórios analisados.	61
Figura 7	Efeito da infecção por ZIKV sobre os parâmetros inflamatórios analisados através da medida do baço, dosagem de quimiocinas e citocinas e extravasamento plasmático.	65
Figura 8	Efeitos da infecção por ZIKV sobre a função e morfologia renal.	67

Figura 9	Efeito da infecção por ZIKV sobre os parâmetros cardiovasculares (pressão arterial sistólica, frequência e eletrocardiograma).	70
Figura 10	Efeito da infecção por ZIKV sobre a função cardíaca analisada por Langendorff.	72
Figura 11	Efeito da infecção por ZIKV sobre a contratilidade de cardiomiócitos e transiente de cálcio.	75
Figura 12	Contração vascular induzida por cloreto de potássio (KCl) em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 3 e 5 dias após a infecção.	77
Figura 13	Contração vascular induzida por fenilefrina (PE) em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 3 e 5 dias após a infecção.	79
Figura 14	Contração vascular induzida por fenilefrina (PE) em anéis de aortas na ausência de endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 3 e 5 dias após a infecção.	81
Figura 15	Envolvimento do receptor do CCR5 na hiporresponsividade vascular à PE em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 5dpi.	82
Figura 16	Análise do envolvimento da enzima ciclooxigenase (COX) e de prostaciclina, na hiporresponsividade vascular à PE em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 5dpi.	84

Figura 17	Análise do envolvimento da proteína quinase A (PKA) na hiporresponsividade vascular à PE em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 5dpi.	86
Figura 18	Análise do envolvimento da enzima óxido nítrico sintase (NOS), na hiporresponsividade vascular à PE em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 5dpi.	87
Figura 19	Avaliação do peso, pressão arterial sistólica e reatividade à PE em fêmeas da linhagem A129	90
Figura 20	Contração vascular induzida por Fenilefrina (PE) em anéis aórticos intactos dos grupos MOCK e ZIKV após infecção congênita.	92

Lista de tabelas

Número da tabela	Título	Página
Tabela 1	Dosagem das citocinas CCL5, CCL2, IL-1β, TNF e IL-6 em aorta, coração e plasma de grupos controle e infectados 3 e 5 dpi.	63
Tabela 2	Análise do extravasamento de azul de Evans nos tecidos cerebral, pulmonar, cardíaco e renal de animais controle e infectados aos 3 e 5 dias dpi, como indicador de permeabilidade vascular.	64
Tabela 3	Análise dos parâmetros do eletrocardiograma de animais controle e infectados aos 3 e 5 dias dpi.	69
Tabela 4	Valores de Emax e pD_2 induzidos por KCl em aortas intactas de animais MOCK e ZIKV, 3 e 5 dpi.	76
Tabela 5	Valores de Emax e pD_2 induzidos por PE em aortas intactas de animais MOCK e ZIKV, 3 e 5 dpi.	78
Tabela 6	Valores de Emax e pD_2 induzidos por PE em aortas sem endotélio de animais MOCK e ZIKV, 3 e 5 dpi.	80
Tabela 7	Valores de Emax e pD_2 induzidos por PE em aortas intactas de animais MOCK e ZIKV 5 dpi, antes e após incubação com Maraviroc ($4x10^{-5}$ mol/L).	82
Tabela 8	Valores de Emax e pD_2 induzidos por PE em aortas intactas de animais MOCK e ZIKV 5 dpi, antes e após	83

incubação com Mofezolac (10^{-6} mol/L), Celecoxib (10^{-6} mol/L) ou RO1138452 (10^{-6} mol/L).

Tabela 9 Valores de Emax e pD_2 induzidos por PE em aortas intactas de animais MOCK e ZIKV 5 dpi, antes e após incubação com KT5720 (10^{-6} mol/L). 85

Tabela 10 Valores de Emax e pD_2 induzidos por PE em aortas intactas de animais MOCK e ZIKV 5 dpi, antes e após incubação com L-NAME (10^{-4} mol/L). 87

Tabela 11 Valores de Emax e pD_2 induzidos pela PE em aortas intactas e camundongos machos e fêmeas da linhagem A129 infectados ou não com ZIKV. 89

Tabela 12 Valores de Emax e pD_2 induzidos pela PE em aortas intactas e camundongos machos e fêmeas cujas mães foram infectadas ou não, durante a gravidez, com ZIKV. 91

Lista de siglas e abreviaturas

Sigla	Significado
ACh	Acetilcolina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
Asn154	Asparagina na posição 154
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CCL2/CCL5	Quimiocinas ligantes do receptor CCR5
CCR5	Receptor de quimiocina C-C tipo 5
CHIKV	Vírus chikungunya
CIB	Cell Isolation Buffer (Tampão de Isolamento Celular)
CK-MB	Creatina quinase MB
CMC	Carboximetilcelulose
COX	Enzima ciclooxigenase
COX-2	Enzima ciclooxigenase-2
CPK	Creatinofosfoquinase
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
Cryo-EM map	Mapa de microscopia crioeletrônica
DENV	Vírus da Dengue
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dpi	Dias pós-infecção
ECG	Eletrocardiograma

EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N′,N′-tetraacético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Emax	Efeito máximo
EMCV	Encefalomiocardite
EPM	Erro padrão da média
ERK1/2	Quinases reguladas por sinal extracelular 1/2
FC	Frequência cardíaca
Fluo-4	Indicador fluorescente de cálcio intracelular
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
hBMECs	Células endoteliais microvasculares cerebrais humanas
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetano-sulfônico
hiPSC-CMs	Cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos
HRP	Peroxidase de rábano (Horseradish Peroxidase)
IFNα/βR-/-	Deficientes para o receptor de interferons do tipo I
IL	Interleucina
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
ISO	Isoprenalina
JEV	Vírus da encefalite Japonesa

KCl	Cloreto de potássio
KT-5720	Inibidor da PKA
L-NAME	Inibidor da óxido nítrico sintase
MAP	Proteína quinase ativada por mitógeno
MAPKs	MAP quinases
MOCK	Grupo controle (não infectado)
ms	Milissegundos
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OMS / WHO	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OPD	o-Phenylenediamine dihydrochloride
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Phosphate-Buffered Saline (tampão salino fosfatado)
PDVE	Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
PE	Fenilefrina
PFU	Plaque Forming Unit (unidade formadora de placa)
PGI_2	Prostaciclina
pD2	Logaritmo negativo da concentração efetiva 50% ($-\log EC_{50}$)
PKA	Proteína quinase A
PLN	Fosfolambano

RO1138452	Antagonista do receptor de prostaciclina
SARS-CoV-2 (COVID-19)	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
SCZ	Infecção congênita por ZIKA
SFB	Soro fetal bovino
SERCA	Sarco/Retículo endoplasmático Ca^{2+}-ATPase
TNF	Fator de necrose tumoral
VCM	Volume corpuscular médio
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Zika Vírus

Sumário

1. Revisão da Literatura 25
1.1 Zika vírus – Problema Mundial de Saúde Pública 25
1.1.1 Histórico e epidemiologia 25
1.2 ZIKA VÍRUS 29
1.2.1 Formas de transmissão 30
1.2.2 Infecção pelo Zika vírus 30
1.2.3 Manifestações clínicas 33
1.2.4 Zika e sistema cardiovascular 34
1.2.5 Mecanismos fisiopatológicos e inflamatórios do Zika no sistema cardiovascular 35
2. Justificativa 39
2.1 Relevância na saúde pública 39
2.1.1 Impacto mundial do Zika 39
2.1.2 Impactos sociais e econômicos: Custos para tratamento de complicações cardiovasculares no sistema público de saúde 39
2.1.3 Complicações extra-neurológicas da infecção 40
2.2 Lacunas no conhecimento 40
Hipótese 41
3. Objetivos 41
Objetivo geral 41
Objetivos específicos 41
4. Material e Métodos 42
4.1 Animais 42
4.1.1 Animais A129 (IFNα/βR$^{-/-}$) 42
4.2 Vírus e cultura celular 43
4.3 Caracterização do estado clínico 43
4.3.1 Score Clínico 43
4.3.2 Avaliação da massa corporal 44
4.3.3 Índice de adiposidade 44
4.3.4 Índice de massa muscular esquelética 44
4.3.5 Controle da ingestão de comida e água 44

4.3.6 Avaliação da glicemia 45
4.4 Análise inflamatória 45
4.4.1 Hemograma 45
4.4.2 Determinação da carga viral em amostras de sangue, coração e aorta: 45
4.4.3 Massa do baço 46
4.4.4 Quantificação de citocinas 46
4.4.5 Análise de permeabilidade vascular por azul de Evans 47
4.5 Análise do impacto renal 48
4.5.1 Análise da função renal 48
4.5.2 Análise histológica e histomorfométrica do tecido renal 48
4.6 Análises dos parâmetros cardiovasculares 49
4.6.1 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca não invasiva 49
4.6.2 Eletrocardiografia 49
4.6.3 Determinação quantitativa da atividade da isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB) 50
4.6.4 Análise da função do coração por Langendorff 50
4.6.5 Isolamento dos cardiomiócitos ventriculares 51
4.6.6 Contratilidade de cardiomiócitos 52
4.6.7 Análise do transiente de cálcio dos cardiomiócitos isolados 52
4.7 Reatividade Vascular 53
4.7.1 Montagem de preparações isoladas 53
4.7.2 Avaliação da viabilidade vascular e da integridade endotelial 53
4.7.3 Caracterização da contração em anéis de aorta com endotélio: 54
4.7.4 Caracterização da contração em anéis de aorta na ausência de endotélio: 54
4.7.5 Estudo dos mecanismos envolvidos na contração em anéis de aorta com endotélio: 54
4.7.6 Impacto da infecção congênita por ZIKV na reatividade vascular 55
4.8 Análise estatística 55
5. Resultados 56
5.1 Caracterização do estado clínico 56
5.1.1 Score Clínico 56
5.1.2 Avaliação da massa corporal 56
5.1.3 Avaliação da massa do músculo tibial anterior e índice de adiposidade 56

5.1.4 Avaliação da ingestão e glicemia 57
5.2 Análise inflamatória 59
5.2.1 Hemograma 59
5.2.2 Determinação da carga viral em amostras de aorta, coração e plasma 60
5.2.3 Massa do baço 62
5.2.4 Dosagem de mediadores pró-inflamatórias 62
5.2.5 Permeabilidade Vascular 63
5.3 Análise do impacto renal 66
5.3.1 Análise da função renal 66
5.3.2 Análise histológica e histomorfométrica do tecido renal 66
5.4 Análises dos parâmetros cardiovasculares 68
5.4.1 Registro da Pressão Arterial Sistólica (PAS) e frequência cardíaca 68
5.4.2 Eletrocardiografia 68
5.4.3 Determinação quantitativa da atividade da isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB) 69
5.4.4 Análise da função cardíaca por Langendorff 71
5.4.5 Contratilidade de cardiomiócitos 73
5.4.6 Transiente de cálcio 73
5.5 Reatividade Vascular 76
5.5.1 Participação do receptor CCR5 na hiporreatividade vascular à PE em aortas de animais infectados por ZIKV 5dpi 81
5.5.2 Participação da enzima ciclooxigenase (Isoforma 1 e 2) e da ativação do receptor de prostaciclina na hiporreatividade vascular à PE em aortas de animais infectados por ZIKV 5dpi 83
5.5.3 Participação da proteína quinase A (PKA) na hiporreatividade vascular 85
5.5.4 Participação de óxido nítrico na hiporreatividade vascular 86
5.6 Impacto da infecção aguda por ZIKV no dimorfismo sexual 88
5.6.1 Papel dos hormônios femininos na infecção por ZIKV 88
Massa corporal 88
Pressão arterial sistólica 88
Reatividade Vascular 88
5.7 Impacto da infecção congênita por ZIKV na reatividade vascular 91
6. Discussão 93
7. Conclusão 111

8. Limitações 112
9. Referências 113
10. Agradecimento às agências de fomento 134

1. Revisão da Literatura

1.1 Zika vírus – Problema Mundial de Saúde Pública

1.1.1 Histórico e epidemiologia

O Zika vírus (ZIKV), é um arbovírus emergente e pertence ao reino *Riboviria,* na família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus* (LINDENBACH B.; THIEL H., 2007). É transmitido pela picada de vetores como mosquitos, carrapatos ou artrópodes. É disseminado pela picada das fêmeas do mosquito *Aedes aegypti,* assim como dengue, febre amarela e Chikungunya e há evidências que pode, também, ser pelo *Culex quinquefasciatus* (SILVA; SPALDING, 2018; GULLAND, 2016). Até o presente momento, estudos genéticos revelaram que o Zika vírus apresenta 3 genótipos distintos: Asiático, Oeste Africano e Leste Africano (LANCIOTTI et al., 2016). Dados epidemiológicos sustentam a hipótese de que essas cepas surgiram a partir da mutação genética do vírus da linhagem asiática (MUSSO; GUBLER, 2016).

O ZIKV foi isolado inicialmente do soro de um macaco Rhesus em um estudo do vírus da Febre Amarela na Floresta de “Ziika” na Uganda em 1947, (HUSSAIN et al., 2018) localizado na África Oriental. Entretanto, só reapareceu em 2007 (60 anos depois), na Ilha Yap, na Micronésia (Oceania) e foi inteiramente sequenciado pela primeira vez (cepa protótipo ZIKV MR766) (MUSSO; GUBLER, 2016). Se disseminou para a Polinésia Francesa e demais ilhas do pacífico em 2013/2014, afetando aproximadamente 75% da população em quatro meses (HUSSAIN et al., 2018). A cepa que afetou a Polinésia Francesa teve maior virulência (MUSSO; GUBLER, 2016).

Em fevereiro de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS – WHO) declarou o ZIKV como uma emergência de saúde pública, de relevância internacional. E ainda há surtos nas Américas, Caribe entre outras localidades (WHO, 2016). Além disso, segundo a Organização das Nações Unidas (ONU - 2017), a circulação do ZIKV nas Américas não foi fácil de ser diagnosticada, pois seus sinais e sintomas são semelhantes aos da dengue e febre amarela, doenças endêmicas nesta região. E após esse surto, a diretora da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), Carissa Etienne, citou que os “sistemas de saúde precisarão estar preparados para

garantir que novas ferramentas sejam introduzidas e que seus benefícios atinjam a todos e não somente a alguns". Futuras "ondas epidêmicas" do Zika continuam sendo prováveis nas Américas. O que também é preocupante é que mais de 500 milhões de pessoas vivem em áreas com risco de transmissão do ZIKV na América Latina e Caribe (ONU – Brasil, 2017).

No Brasil, a infecção por ZIKV foi registrada, pela primeira vez em 2015, no nordeste do país (SONG et al., 2017; SILVA; SPALDING, 2018). Os pacientes apresentaram exantema baixa ou nenhuma febre, presença de artralgia, edema e conjuntivite, o que levou aos médicos suspeitarem de infecção causada pelo vírus Zika. Em abril de 2015, por meio do teste de PCR, foi confirmada a infecção por ZIKV. Dos testes realizados em 25 pacientes suspeitos advindos da Bahia, 8 foram positivos para ZIKV, além de outros 8 dos 21 casos no Rio Grande do Norte (ZANLUCA et al., 2015; CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015).

Após o grande número de pessoas apresentando os sintomas clássicos da zika, iniciaram as notificações de casos neurológicos, potencialmente associados a esta arbovirose (BRITO, 2015). Ainda no ano de 2015, e desde então, o Brasil tem sido o país mais atingido pelas complicações do ZIKV, em que foram notificados mais de 4.000 bebês que nasceram com microcefalia devido a esta infecção (GULLAND, 2016). Os primeiros relatos de sintomas neurológicos foram descritos na Polinésia Francesa no ano de 2013. E em 2015/2016, após o surto de zika, foram relatados 40 casos da síndrome de Guillain-Barré associados à infecção por zika a partir da testagem por meio da detecção do genoma viral (BRITO, 2015). No Brasil, especificamente em Pernambuco, observou-se elevados números de casos desde abril de 2015. Foram testados positivos para zika sete pacientes, por meio de RT-PCR, e desses sete, quatro foram diagnosticados com Guillain-Barré (BRITO, 2015).

Dados do ministério da saúde sobre o painel de monitoramento das arboviroses, em destaque a Zika, mostrou que em 2015 o Brasil registrou mais de 51.000 casos prováveis. Esse valor subiu de forma significativa no ano de 2016 (ano do grande surto de ZIKV) com 213.350 casos, que foram diminuindo ao longo dos anos. A situação epidemiológica foi atualizada em dezembro de 2023 com a notificação de mais de 7.000 casos no país. A notificação é de suma importância para o acompanhamento da doença no país e no mundo. No ano de 2024, o ministério da

saúde divulgou em seu website, o mapa com a distribuição dos casos prováveis de zika no país e uma maior incidência nas regiões norte, nordeste e centro-oeste, podendo ser consideradas como regiões endêmicas (Figura 1) (BRASIL, 2024). De acordo com o monitoramento do ministério da saúde, comparado com outras arboviroses, a infecção pelo ZIKV é uma das arboviroses com menor notificação e com sintomas mais brandos. Entretanto, essa infecção pode gerar sequelas permanentes, inviabilizando a vida dos indivíduos, como é o caso da microcefalia.

Unidade Federada	Coeficiente de incidência	Casos prováveis
Rio Grande do Norte	34,1	1.175
Amapá	33,1	266
Acre	13,9	122
Mato Grosso	13,3	511
Bahia	8,2	1.210
Maranhão	4,9	345
Rondônia	4,8	83
Tocantins	4,1	64
Roraima	3,5	25
Mato Grosso do Sul	3,0	87
Paraíba	2,4	100
Pernambuco	2,4	225
Alagoas	2,2	70
Espírito Santo	2,2	89
Amazonas	2,1	89
Goiás	1,7	124
Ceará	1,7	154
Pará	1,6	135
Sergipe	0,9	21
Minas Gerais	0,9	187
Distrito Federal	0,4	13
Piauí	0,4	13
São Paulo	0,4	179
Paraná	0,2	20
Rio Grande do Sul	0,2	18
Santa Catarina	0,1	10
Rio de Janeiro	0,0	2

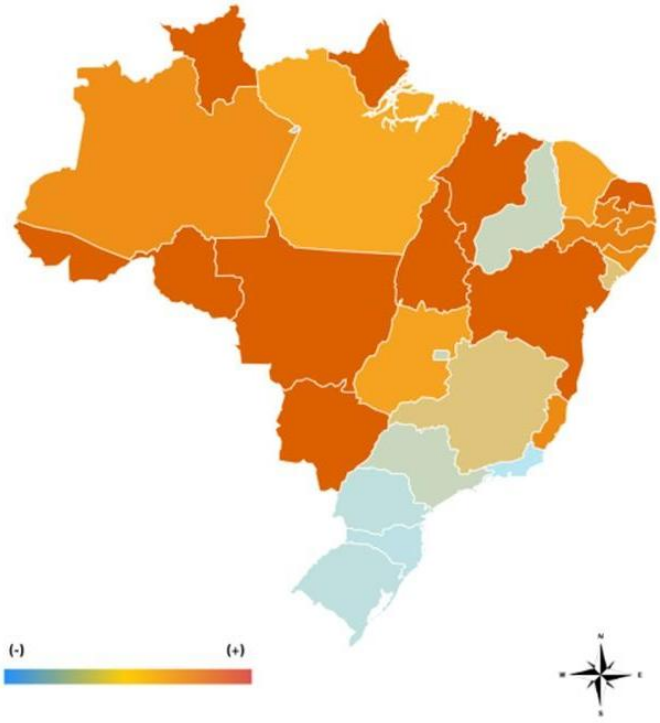


Figura 1: **Casos prováveis de infecção por ZIKV em 2024.** Há maior incidência da infecção nas regiões norte, nordeste e centro-oeste. Fonte: Ministério da Saúde, Brasil, 2024.

A associação da infecção por ZIKV com microcefalia e distúrbios neurológicos graves, vem causando preocupações globais (GULLAND, 2016; LI X. et al., 2016), podendo ocasionar também restrição de crescimento intrauterino, dano placentário, e morte fetal (LI X. et al., 2016). Calvet e colaboradores (2016), realizaram um estudo de caso no estado da Paraíba, onde eles detectaram e sequenciaram o genoma do ZIKV no líquido amniótico de fetos com microcefalia, e de Araújo et al. (2018) foram um dos primeiros a realizarem um estudo caso-controle que confirmaram a associação entre infecção congênita pelo vírus Zika e microcefalia em neonatos no Brasil (CALVET et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2018).

Um outro trabalho brasileiro, realizado por Brasil e colaboradores (2016) foi pioneiro em realizar estudo com mulheres grávidas infectadas por ZIKV (confirmado por RT-PCR), no estado do Rio de Janeiro, ou seja, fora da região nordeste do país, demonstrando que a infecção por ZIKV e os acometimentos neurológicos já não estavam isolados em uma única região e já estavam se espalhando (BRASIL et al., 2016). O trabalho de Brasil et al. (2016) mostrou que 117 bebês nascidos vivos, de 116 mulheres infectadas por ZIKV, 42% deles apresentaram alteração cerebral graves e entre esses, 4 com microcefalia. Essas alterações eram independentes do trimestre gestacional que essas mulheres se encontravam (BRASIL et al., 2016).

O surto da Zika iniciou em 2015, mas ainda hoje há notificações de nascimento de crianças com microcefalia em função da infecção congênita por ZIKA (SCZ), como pode ser visto na figura 2 representada pela linha vermelha no gráfico (BRASIL, 2024, p. 3). Além de tais complicações no sistema nervoso central, a infecção por ZIKV também pode acometer o sistema cardiovascular (KRITTANAWONG; ZHANG; SUN et al., 2016), como por exemplo, gerando uma perigosa condição do ritmo cardíaco e possível insuficiência cardíaca (HUSSAIN et al., 2018).

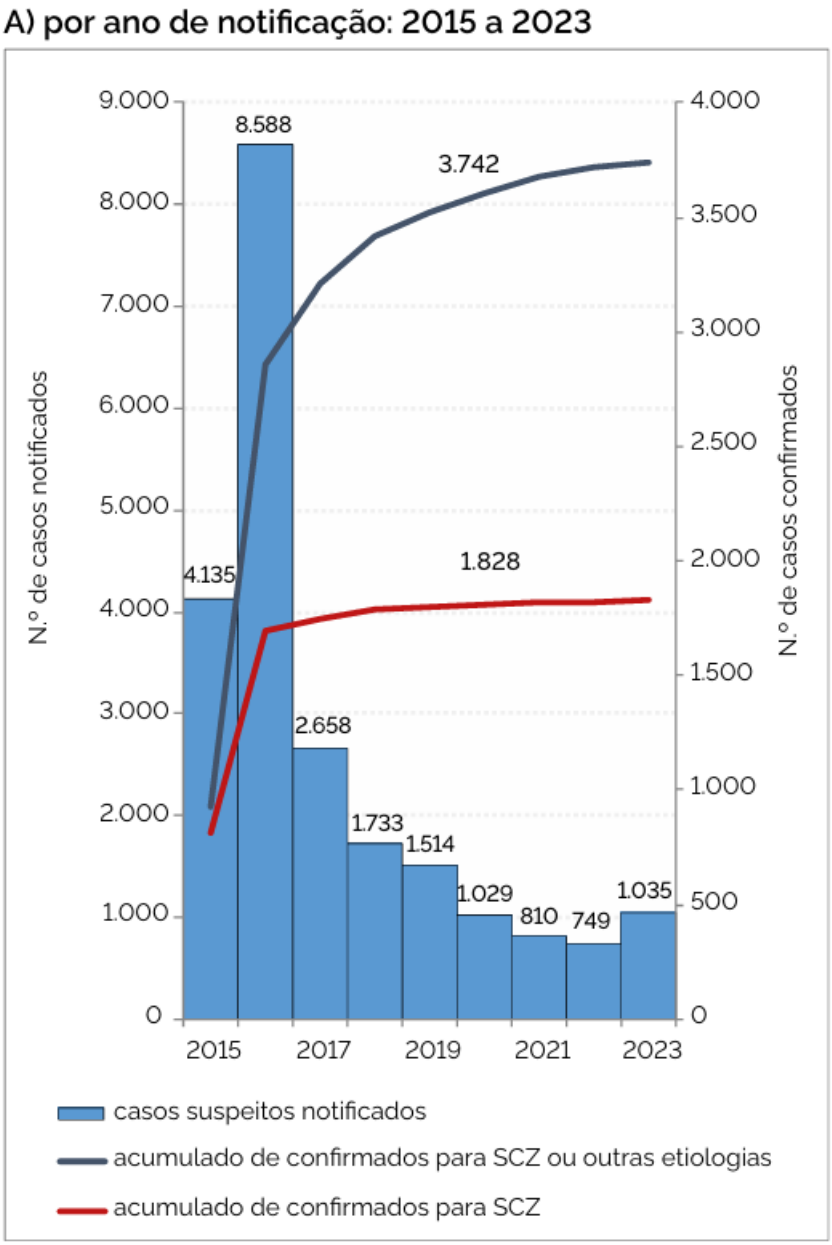


Figura 2: **Casos notificados/confirmados de infecção por ZIKV em 2024.** Há maior incidência da infecção nas regiões norte, nordeste e centro-oeste. Fonte: *Boletim epidemiológico: volume 55, nº 05, p. 10.* Ministério da Saúde, Brasil, 2024.

1.2 ZIKA VÍRUS

O vírus da Zika é envelopado e apresenta formato esférico com um capsídeo icosaédrico contendo um RNA de sentido positivo e com um genoma não segmentado. Toda sua estrutura tem cerca de 50 nm de diâmetro e é composto por 10.794 bases nitrogenadas. O sequenciamento genético mostrou que o ZIKV tem níveis de homologia semelhantes a outros flavivírus (HUSSAIN et al., 2018), como o

vírus da Febre Amarela (YFV), vírus do Oeste de Nilo (WNV), o vírus da encefalite Japonesa (JEV) e o vírus da Dengue (DENV) com seus quatro sorotipos 1-4 (MLERA; MELIK; BLOOM, 2014).

1.2.1 Formas de transmissão

As fêmeas do mosquito *Aedes,* realizam a postura de ovos em locais com alta umidade e as larvas sofrem metamorfose para as pupas e posteriormente atingem a fase adulta. Tal ciclo pode levar até 3 semanas para ser concluído. Na fase adulta, a fêmea ao se alimentar de sangue, pode produzir cerca de 100 a 200 ovos e o ciclo se reinicia (HUSSAIN et al., 2018).

A circulação simultânea do ZIKV com o vírus da dengue (DENV) e o vírus chikungunya (CHIKV) já foi vista nas Américas (Brasil), Polinésia Francesa, Ásia e demais localidades. Certamente o ZIKV está seguindo os caminhos de DENV e CHIKV espalhando por países onde o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* circulam e infectam indivíduos. A forma de transmissão mais comum é a horizontal, ou seja, através da picada do vetor quando ele for se alimentar de sangue e injeta, no ato da picada, saliva infecciosa. Entretanto, também ocorre transmissão não vetorial de arbovírus, como a transmissão vertical (mãe-filho), nosocomial por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e/ou medula óssea e não se pode descartar a via sexual (MUSSO; GUBLER, 2016; HUSSAIN et al., 2018).

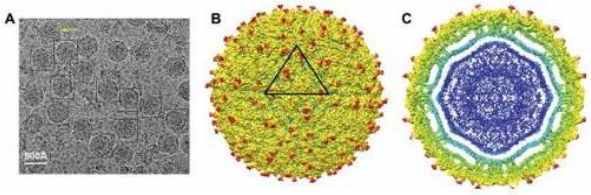
Para ocorrer as transmissões, o ZIKV propaga-se no ambiente através de dois ciclos: enzoótico e urbano. O primeiro ocorre entre primatas e espécies silvestres de *Aedes spp.* Já no ciclo urbano, a transmissão ocorre entre seres humanos e espécies domésticas de *Aedes spp.* Por apresentar tais características, os arbovírus têm ampla capacidade de expansão geográfica e geram preocupação em relação à saúde pública (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019).

1.2.2 Infecção pelo Zika vírus

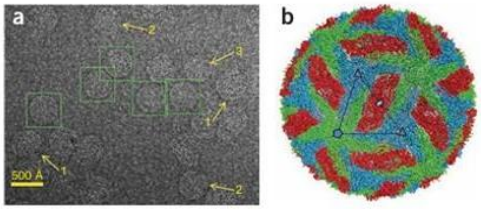
O estudo utilizando um mapa de microscopia crioeletrônica (Cryo-EM map) analisou a estrutura tridimensional do vírus zika e observou que a estrutural viral do ZIKV maduro é similar à estrutura do vírus dengue (DENV) e também do vírus do oeste do Nilo (WNV), como pode ser observado na figura 3 (SIROHI et al., 2016;

ZHANG et al., 2012; KOSTYUCHENKO et al., 2016; MUKHOPADHYAY et al., 2003). Apesar da semelhança em suas estruturas, os flavivírus apresentam algumas particularidades. Em destaque para o ZIKV, de acordo com Sirohi et al. (2016), apresenta uma inserção de cinco resíduos na proteína E, uma proteína do envelope viral, e glicosilação em Asn154, que não se encontra no DENV, favorecendo o tropismo do ZIKV para infectar células neuronais e placentárias, o que explica os acometimentos no sistema nervoso central na infecção congênita por esse vírus (SIROHI et al., 2016).

A estrutura crio-EM do vírus Zika
SIROHI et al., 2016



Visão geral da estrutura crio-EM do vírus da dengue.
ZHANG et al., 2012



Estrutura do vírus do Nilo Ocidental
determinada por crio-EM. MUKHOPADHYAY et al., 2003

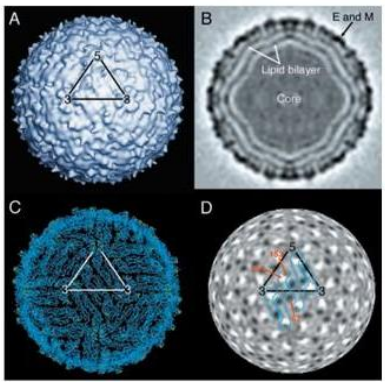


Figura 3: **Microscopia crioeletrônica (Cryo-EM map) analisou a estrutura tridimensional dos vírus Zika, dengue e oeste do Nilo, respectivamente.** Adaptado de: SIROHI et al., 2016; ZHANG et al., 2012; MUKHOPADHYAY et al., 2003.

Para infectar uma célula e dar início à replicação viral é primordial a participação de proteínas não estruturais do ZIKV e também de regiões não traduzidas de seu RNA. Portanto, para que o ZIKV adentre a célula-alvo, ocorre uma interação entre a glicoproteína E do envelope do vírus e os receptores celulares de membrana, causando a fusão viral e a entrada na célula-alvo. O ZIKV interage com vários receptores celulares e é através deles que o vírus é internalizado por endocitose criando o endossomo. No interior da célula, o RNA viral de sentido positivo é liberado no citoplasma, é traduzido e replicado. No retículo endoplasmático, o RNA é empacotado. No complexo de Golgi, o vírus é clivado gerando as partículas virais maduras e, em sequência, são liberadas, como pode ser melhor visualizada na figura 4 (QADIR; RIAZ; SAEED; SHAHZAD-UL-HUSSAN, 2018).

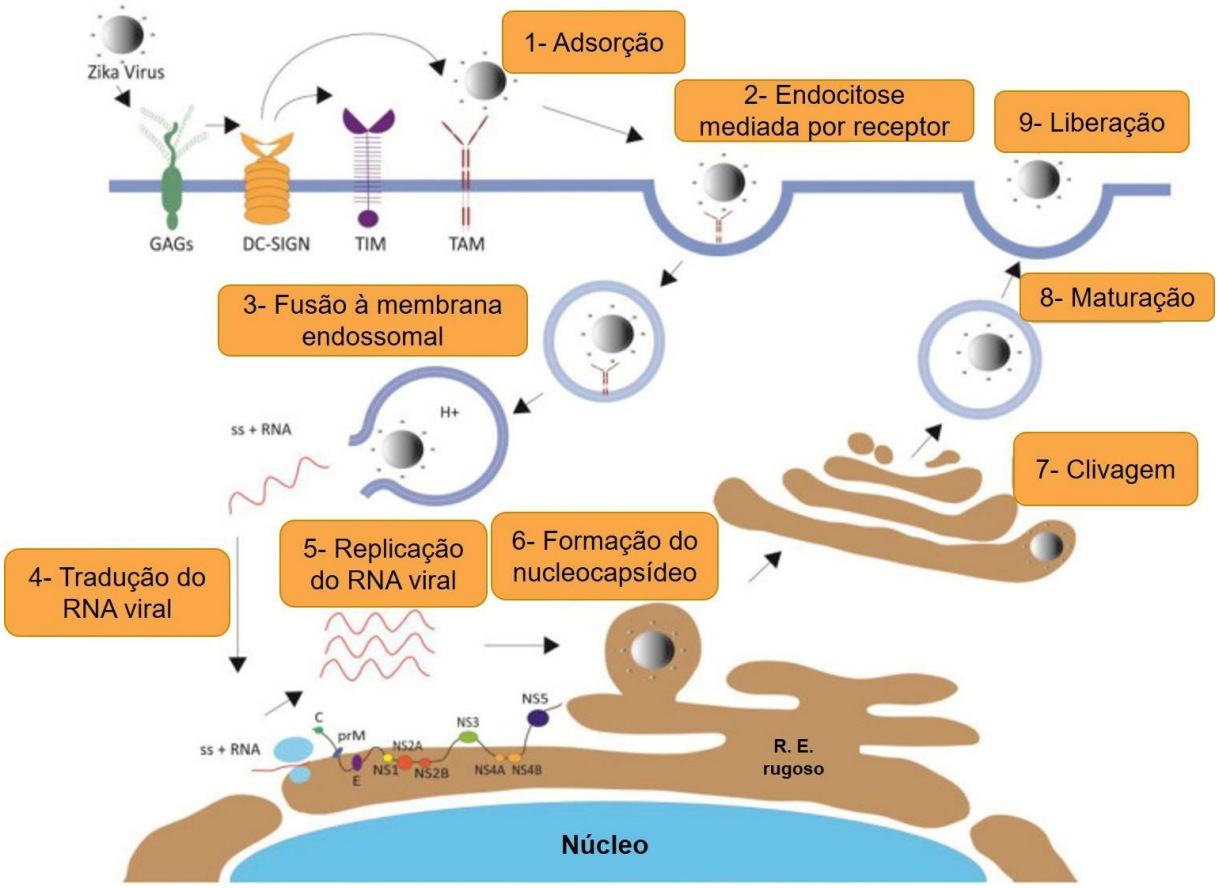


Figura 4: **Ciclo de replicação do ZIKV.** A imagem foi adaptada de QADIR; RIAZ; SAEED; SHAHZAD-UL-HUSSAN (2018), ilustra a replicação do ZIKV, endocitose, ligação do vírus à membrana endossômica, replicação de RNA, maturação e liberação.

De fato, é inegável a atração do ZIKV para o cérebro e regiões cerebrais. Entretanto, a presença do vírus já foi vista em outros tecidos e é indicativo de lesão

tecidual podendo causar disfunção orgânica. A determinação da carga viral e a presença de lesão foi identificada em animais infectados por ZIKV com 1 a 5 dias de vida no músculo esquelético e no miocárdio, apresentando miocardite (WEINBREN; WILLIAMS, 1958). Outros trabalhos na literatura mostraram recentemente que a presença do vírus foi detectada também no coração, fígado, baço, pulmões, rins, intestinos, medula espinhal (LI et al., 2022), além de estômago, bexiga, linfonodos (LI X. et al., 2016). Portanto, o ZIKV apresenta tropismo por outros órgãos, além dos órgãos do sistema nervoso central e o sistema cardiovascular é um dos sistemas mais afetados.

1.2.3 Manifestações clínicas

De acordo com relatos da literatura, cerca de 80% de indivíduos infectados com ZIKV não desenvolvem manifestações clínicas, entretanto, quando esses sintomas se apresentam, os indivíduos infectados podem manifestar febre aguda, com duração de 3 a 7 dias, mialgia, hiperemia conjuntival não purulenta e sem prurido, fraqueza generalizada, artralgia (que pode persistir por volta de 30 dias), edema periarticular e cefaleia (DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2019). Os sinais e sintomas da infecção por zika vírus podem aparecer após 3 a 15 dias do momento da infecção. Geralmente são sintomas leves como erupção cutânea, febre, dor nas articulações e conjuntivite. Sintomas neurológicos, como a síndrome de Guillain-Barré, são mais raros (QADIR et al., 2018).

Além desses sintomas, já é muito bem descrita a relação do vírus da zika com a microcefalia, além de outras alterações como neuropatia óptica, glaucoma congênito, erupção cutânea maculopapular e principalmente anomalias cardiovasculares, como fibrilação atrial (HUSSAIN et al., 2018).

Como dito, apesar da maioria dos casos de zika se apresentar sem sintomas, a infecção por esse vírus, como outras causadas por flavivírus, como dengue e chikungunya, tem maior propensão a gerar complicações cardiovasculares como miocardite e pericardite (WAGGONER et al., 2017). Resultados da literatura mostraram que tais pacientes também apresentaram dor no peito e elevados valores de marcadores cardíacos, como troponina I e creatinofosfoquinase (CPK), além de alterações eletrocardiográficas (WAGGONER et al., 2017). Necropsias em indivíduos

não humanos revelaram a presença de RNA de ZIKV no sistema nervoso central e em órgãos viscerais, como no coração (LI X. et al., 2016).

1.2.4 Zika e sistema cardiovascular

São esperadas alterações cardiovasculares relacionadas a infecção por ZIKV, uma vez que outras doenças causadas por flavivírus, como dengue e chikungunya, tem o sistema cardiovascular como órgão alvo (ALVAREZ et al., 2017). Minhas e colaboradores (2017), estudaram 9 adultos, sem história cardíaca prévia, que foram infectados pelo ZIKV. É o primeiro trabalho que apresenta a correlação entre infecção por Zika vírus e alterações cardiovasculares, mesmo que com um reduzido número de pacientes (MINHAS, 2017). O grupo de pesquisa acompanhou esses pacientes por 6 meses e observaram que após aproximadamente 10 dias dos primeiros sintomas de infecção por ZIKV, tais pacientes já apresentaram alterações cardíacas, sentindo palpitações, fadiga e perda de fôlego. Então foram realizados exames clínicos como eletrocardiograma, ecocardiograma e ressonância magnética. Dos 9 pacientes analisados, 6 apresentaram insuficiência cardíaca (66,7%) (sendo 5 com baixa fração de ejeção), 8 pacientes apresentaram ritmo cardíaco irregular (88,9%). Essa arritmia cardíaca, foi marcada por situações de fibrilação atrial paroxística e persistente, taquicardia atrial e arritmias ventriculares. Também foi visualizado derrame pericárdico moderado a grave (MINHAS, 2017).

A partir deste trabalho, novos estudos têm sido publicados a respeito da infecção por ZIKV e seus efeitos deletérios no coração. Na pesquisa realizada por Carta et al. (2017), o que mais se destacou foi o grau de gravidade das alterações cardíacas, além de uma rápida progressão (CARTA et al., 2017). Os pacientes precisam ser diagnosticados e tratados em um estágio inicial antes que o dano se torne irreversível. O estudo citado fornece fortes e claras evidências de que há uma relação da infecção pelo ZIKV e complicações cardiovasculares (CARTA et al., 2017). Entretanto, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos envolvidos e a fisiopatologia das alterações cardiovasculares que essa infecção é capaz de desencadear (WAGGONER et al., 2017).

Partindo do princípio da semelhança filogenética entre o ZIKV e os demais flavivírus, como é o caso do vírus do Nilo Ocidental, que pode gerar miocardite

causando uma arritmia fatal (KRITTANAWONG; ZHANG; SUN, 2016), uma infecção por ZIKV pode ser igualmente grave ao sistema cardiovascular. As complicações cardiovasculares também foram observadas na infecção pelo vírus da Chikungunya (CHIKV), como por exemplo hipotensão, choque e colapso circulatório, além de arritmias, sopros, miocardite, insuficiência cardíaca, além de alterações nos marcadores de função cardíaca, como elevação de troponina e CPK (ALVAREZ et al., 2017). Hussain e colaboradores (2018), citaram que pacientes infectados por ZIKV, podem apresentar fibrilação atrial, caracterizado por batimentos cardíacos acelerados e irregulares, sem sincronização, com maior prevalência de apresentar acidente vascular encefálico, insuficiência cardíaca e demais complicações, podendo ser fatais (HUSSAIN et al., 2018).

Atualmente ainda não há vacinas ou tratamentos específicos disponíveis para a zika, muito devido à escassez de estudos referentes à fisiopatologia da infecção pelo vírus. A partir de todos os fatores citados acima, somado à fácil transmissibilidade do vírus e à associação com distúrbios cardiovasculares, estudos sobre a interação do vírus com o hospedeiro são importantes para a identificação de alvos terapêuticos.

1.2.5 Mecanismos fisiopatológicos e inflamatórios do Zika no sistema cardiovascular

Quando presente no organismo, o ZIKV pode afetar o sistema cardiovascular devido à ativação de vias pró-inflamatórias, gerando disfunção cardiovascular. A infecção pode levar ao aumento da produção de citocinas e quimiocinas, infiltração de leucócitos, estresse oxidativo. Essas alterações quando ocorrem no coração podem desencadear miocardite, alterando a função e a estrutura. Também pode ocorrer disfunção endotelial vascular, como foi visto por BAI et al., 2020 e HE et al., 2018 em camundongos.

Shaheen e colaboradores (2019), mostraram que a proteína do capsídeo do vírus da encefalomiocardite (EMCV) e também o genoma são capazes de estimular a ativação da sinalização pró-inflamatória como por exemplo MAP quinases (MAPKs), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e NF-κB, e essas vias regulam a transcrição e tradução dos genes pró-inflamatórios como é o caso da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), citocina IL-1β e da enzima ciclooxigenase (COX)-2 (SHAHEEN et

al., 2019). Diversas vias inflamatórias podem ser ativadas por receptores específicos, os quais, além de participarem da resposta imune, também podem favorecer a replicação viral. Entre esses receptores, destaca-se o CCR5.

Além disso, o receptor CCR5 está envolvido em diversos processos patológicos, incluindo infecções virais, como as causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LOPALCO et al., 2000), além de já ter sido investigado na doença de Alzheimer (HUANG et al., 2024), na hipertensão e disfunção vascular (COSTA et al., 2024) e no câncer (ZHOU et al., 2020; SUAREZ-CARMONA et al., 2019), bem como em infecções por arbovírus. Marques e colaboradores (2015), ao estudarem a infecção pelo dengue vírus (DENV), observaram que CCR5 é essencial para a replicação do DENV em macrófagos humanos e murinos. Também viram que a infecção induz aumento na expressão de ligantes desse receptor e como é fundamental para a replicação viral, o antagonismo de CCR5 pode ser um alvo terapêutico para a dengue (MARQUES et al., 2015). Um exemplo desses ligantes endógenos que ativam CCR5 incluem as quimiocinas, como a CCL5 (SHAHEEN et al., 2019).

A quimiocina CCL5 é expressa por vários tipos de células, incluindo linfócitos T, macrófagos, eosinófilos e células endoteliais (ALDINUCCI; BORGHESE; CASAGRANDE, 2020). E essa quimiocina interage com receptores acoplados à proteína G (GPCRs), CCR1, CCR3 ou CCR5, resultando em respostas de sinalização específicas do tipo de célula (LIN et al., 1999; CHAN et al., 2012; ZLOTNIK; YOSHIE, 2012).

De acordo com Mladinich e colaboradores (2021), a infecção pelo ZIKV aumentou a liberação de CCL5 e essa quimiocina induzida pela infecção viral ativa os receptores CCR3 e CCR5, promovendo respostas de sobrevivência por meio da ativação de ERK1/2 em células endoteliais microvasculares cerebrais humanas (hBMECs). Essa via quando ativada por CCL5 é crítica para a persistência do ZIKV em hBMECs (MLADINICH et al., 2021). Além da via de ERK1/2, a CCL5 também pode estar relacionada com via de enzimas, como a ciclooxigenase (COX). Embora a relação direta entre CCR5 e COX ainda não esteja completamente estabelecida, estudos demonstram que a ativação de vias inflamatórias pode modular a expressão de COX (MATURU et al., 2017).

A produção de eicosanoides derivados do ácido araquidônico e catalisado pela enzima COX, como por exemplo a prostaciclina, pode também gerar respostas pró-inflamatórias e vasorelaxantes por meio do aumento de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). A ação de relaxamento de vasos sanguíneos através da ativação de AMPc é discutida há muitos anos (KUKOVETZ; HOLZMANN; WURM; PÖCH, 1979).

Outras vias pró-inflamatórias também podem envolver a participação de AMPc, assim como da proteína quinase A (PKA), uma das principais enzimas efetoras. A ativação da via AMPc/PKA pode influenciar a resposta imune e alterar a sinalização intracelular associadas à inflamação. Yan e colaboradores (2021), observaram que a ativação do CCR5 por CCL5 promove morte celular regulada desencadeada por sinais pró-inflamatórios através da via de sinalização CCR5/PKA/CREB (YAN et al, 2021). Banerjee et al. (2017) estudaram o vírus HIV-1 e a ativação de vias pró-inflamatórias como CCR5, AMPc e PKA sendo importantes para a replicação HIV-1 (BANERJEE et al., 2017). Ou seja, infecções desencadeiam a liberação de citocinas pró-inflamatórias e essas citocinas são capazes de ativar vias de sinalização intracelular, como é o exemplo das vias β-adrenérgica/AMPc/PKA, que indiretamente aumentam a contratilidade momentaneamente e posterior apoptose celular (WANG Y. et al., 2015; QIAN et al., 2023).

No coração, fisiologicamente, o AMPc é crucial para a função cardíaca em resposta à estimulação dos receptores cardíacos β-adrenérgicos (β-ARs) (FU et al. 2025). E a ativação do sistema nervoso simpático ocasiona a liberação de catecolaminas, que interagem com esses receptores β-adrenérgicos no coração. A estimulação β-adrenérgica cardíaca ativa a adenilato ciclase gerando AMPc e à ativação da PKA (LI et al. 2000). Quando ativada, a PKA pode fosforilar várias proteínas que regulam a contratilidade e relaxamento cardíaco como os canais de cálcio do tipo L (NYSTORIAK et al., 2017), receptores de rianodina (ULLRICH; VALDIVIA; NIGGLI, 2012), troponina, reduzindo a afinidade pelo cálcio (MARSTON, 2022), fosfolambam impactando da atividade da SERCA em recaptar o cálcio (MATTIAZZI; KRANIAS, 2014; QIN et al., 2022), ocasionando inotropismo (aumento da contratilidade), lusitropismo (aumento da velocidade de relaxamento) e cronotropismo positivos (aumento da frequência cardíaca). Apesar da importância na função cardíaca, a PKA também pode contribuir para o desenvolvimento de doenças cardíacas importantes, quando desregulada.

Alterações na atividade da PKA, seja por aumento ou diminuição, podem desencadear processos patológicos no coração. A ativação de PKA já esteve relacionada ao aumento de hipertrofia cardíaca, por exemplo (LIU et al., 2021). Entretanto, Fu e colaboradores (2025) observaram, em camundongos da linhagem C57BL/6J, que a redução a atividade de cAMP-PKA também gerava hipertrofia de cardiomiócitos e lesão mitocondrial por inibição da mitofagia (FU et al., 2025).

Os mecanismos citados previamente sustentam a hipótese de que a via CCR5/ COX/ prostaciclina/ PKA pode participar de uma resposta cardíaca e vascular gerada pela infecção aguda por ZIKV. A ativação dessa via poderia contribuir para uma resposta inflamatória e consequentemente gerar hiporreatividade vascular, e hipercontratilidade cardíaca momentânea, salientado a complexidade da interação entre as alterações inflamatórias e o sistema cardiovascular na infecção aguda por ZIKV. Ainda que esses mecanismos sejam respaldados por evidências empíricas, a literatura ainda necessita de estudos que investiguem detalhadamente os efeitos cardiovasculares da infecção pelo ZIKV e os caminhos moleculares envolvidos.

Há na literatura trabalhos avaliando o impacto cardíaco da infecção pelo ZIKV em humanos, mas são escassos e não relatam exatamente os mecanismos envolvidos nas alterações visualizadas. Sobre o impacto no sistema vascular, existe uma grande lacuna que dificulta o entendimento completo do impacto da infecção por esse vírus. Sendo assim, o estudo do ZIKV, relacionado ao comprometimento do sistema cardiovascular é urgentemente necessário a fim de determinar o(s) mecanismo(s) exato(s) por meio do qual essas condições cardiovasculares surgem e até aproximarmos da prevenção e tratamento das mesmas.

2. Justificativa

2.1 Relevância na saúde pública

2.1.1 Impacto mundial do Zika

No Brasil, em 2016, de fevereiro a abril, cerca de 91 mil casos de Zika foram notificados (FIOCRUZ, 2016). Nesse mesmo ano, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o surto de Zika, como uma situação de emergência de saúde global, principalmente devido ao receio de que tal infecção gerasse defeitos congênitos, como é o caso da microcefalia (KRITTANAWONG; ZHANG; SUN et al., 2016; WHO, 2016).

De acordo com dados atuais da Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde), no primeiro semestre do ano de 2020, 5.334 prováveis casos de zika vírus (ZIKV) no país já foram notificados, ou seja, taxa de incidência de 2,5 casos por 100 mil habitantes, sendo a região Nordeste a região com a maior taxa de incidência (6,2 casos/100 mil habitantes). Ainda não houve registro de óbito confirmado por ZIKV no Brasil para esse ano, porém ainda há subnotificação de dados (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2020).

2.1.2 Impactos sociais e econômicos: Custos para tratamento de complicações cardiovasculares no sistema público de saúde

Além de prejuízos para o bem estar da população, a infecção por ZIKV também despende elevados custos para os cofres públicos. Estimou-se que o custo da epidemia de Zika durante o surto foi de US$ 7 a 18 bilhões ao longo de três anos, no período de 2015 a 2017(ONU – Brasil, 2017; Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento, 2017).

O ZIKV é um arbovírus emergente, que causa surtos sazonais (SILVA; SPALDING, 2018) e que está filogeneticamente relacionado a outros flavivírus que também possuem grande importância para a saúde pública mundial, como é o caso do vírus da dengue (DENV – sorotipos 1-4), febre amarela (YFV), encefalite japonesa (JEV) e vírus do Nilo Ocidental (WNV) (SONG et al., 2017). Além da transmissão vetorial, existem evidências de que o ZIKV possa ser transmitido por via congênita,

ato sexual e, supostamente, por transfusão sanguínea (SILVA; SPALDING, 2018), o que torna a transmissibilidade de tal vírus bastante preocupante.

2.1.3 Complicações extra-neurológicas da infecção

A infecção por ZIKV, quando acomete adultos saudáveis, é normalmente leve ou assintomática, entretanto, pode resultar em casos mais graves, causando, por exemplo, paralisia ascendente -síndrome de *Guillain-Barré*- ou lesão inflamatória no coração, cérebro ou medula espinhal (STEINBACH et al., 2020). Além das complicações neurológicas, a infecção por ZIKV também pode causar distúrbios cardiovasculares de curto ou longo prazo (KRITTANAWONG; ZHANG; SUN et al., 2016). Entre esses distúrbios cardiovasculares, destacam-se miocardite, pericardite e arritmias, distúrbios no segmento ST do eletrocardiograma, insuficiência cardíaca de reduzida fração de ejeção, fibrilação atrial, entre outras complicações importantes (BANDYOPADHYAY et al., 2018; MINHAS et al., 2017; ABDALLA et al., 2018; KRITTANAWONG, 2017; CARTA et al., 2017; RESIERE et al., 2018; ALETTI, et al., 2016). Além dessas intercorrências, Li X. e colaboradores (2016) observaram que, em necrópsias de macacos Rhesus infectados com ZIKV, havia a presença de RNA de ZIKV em órgãos viscerais, como o coração. Contudo, pouco ainda se sabe sobre a fisiopatologia e os mecanismos moleculares envolvidos nas doenças cardiovasculares associadas à infecção por ZIKV.

2.2 Lacunas no conhecimento

Baseado em todos esses achados, sabe-se que ainda há uma escassez de pesquisas e trabalhos na área, sendo de extrema necessidade mais estudos e evidências, para minimizar os danos gerados por tal infecção, principalmente no sistema cardiovascular. O conhecimento do impacto da infecção pelo ZIKV nesse sistema e dos mecanismos que estão envolvidos nesse quadro, pode auxiliar num futuro próximo minimizando custos para o país e no desenvolvimento de alvos terapêuticos principalmente em regiões endêmicas, mitigando possíveis complicações da infecção pelo ZIKV no sistema cardiovascular.

Hipótese

A infecção aguda por ZIKV ativa a via CCR5/ COX/ prostaciclina/ PKA, causa uma resposta inflamatória aguda e consequentemente gera hiporreatividade vascular, e hipercontratilidade cardíaca.

3. Objetivos

Objetivo geral

Investigar as alterações cardiovasculares e os mecanismos envolvidos na infecção pelo ZIKV.

Objetivos específicos

- Avaliar, na fase aguda da infecção por Zika vírus, alterações:

- No estado clínico (escore clínico, massa corporal, índice de adiposidade, massa muscular, ingestão de alimentos e hidratação e índice glicêmico);
- No perfil hematológico/inflamatório;
- Na função renal;
- Nos parâmetros cardiovasculares (pressão arterial, eletrocardiograma);
- Nas propriedades mecânicas e funcionais do coração isolado (Langendorff e contratilidade cardíaca - cardiomiócitos isolados e transiente de cálcio);
- Na reatividade vascular de aortas de machos e mecanismos envolvidos (envolvimento de CCR5, COX, PGI_2, PKA, óxido nítrico);
- Na reatividade vascular de aortas de fêmeas.

- Avaliar, de forma crônica a infecção congênita por zika vírus, alterações na reatividade vascular de machos e fêmeas.

4. Material e Métodos

4.1 Animais

Os experimentos foram realizados com camundongos machos e fêmeas (não prenhes) da linhagem **A129**, deficientes para o receptor de interferons do tipo I (IFNα/βR$^{-/-}$), originalmente adquiridos da empresa *The Jackson Laboratories* (referência 010830) e provenientes do Biotério de Matrizes da Universidade de São Paulo (USP). Os animais receberam injeção de 4x10^3 unidades formadoras de placa (PFU) de ZIKV HS-2015-BA-01 ou veículo/animal. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA 7/2022).

Para o estudo da infecção congênita, foram utilizados camundongos fêmeas prenhes da linhagem **C57BL/6**, que receberam injeção de PBS ou 1×10^6 PFU/animal da amostra de ZIKV (HS-2015-BA-01). A prole foi avaliada na 12ª semana de vida. Esse protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA 319/2022).

Assim, o presente trabalho contou com **duas linhagens distintas de animais**: (i) A129, machos e fêmeas, utilizados no estudo da infecção aguda, por apresentarem imunossupressão decorrente da deficiência no receptor de interferon tipo I, o que os torna suscetíveis à infecção, embora não sobrevivam por mais de seis dias após exposição ao inóculo viral utilizado; e (ii) C57BL/6 prenhes, escolhidas para o modelo de infecção congênita, uma vez que necessitavam manter a gestação até o termo.

Todos os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Imunofarmacologia até atingirem a idade adequada para experimentação (8 a 12 semanas), em temperatura controlada (23 °C), ciclos claros/escuros de 12 horas, com água e ração disponíveis ad libitum.

4.1.1 Animais A129 (IFNα/βR$^{-/-}$)

Os animais A129 são camundongos homozigotos para a mutação knock-out *de Ifnar1* (nocautes para receptores de interferon do tipo I, ou seja, não apresentam os receptores α/β). Os interferons são fundamentais para a defesa antiviral (MÜLLER et al., 1994), logo, esses animais são mais suscetíveis à infecção por zika vírus e

apresentam alterações macroscópicas e microscópicas graves (COSTA et al., 2012; COSTA et al., 2022; BATISTA et al. 2025).

4.2 Vírus e cultura celular

O vírus utilizado neste trabalho foi um isolado clínico contemporâneo de ZIKV (HS-2015-BA-01; disponível em ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX520666) obtido a partir do soro de um paciente sintomático que apresentava viremia na cidade de Salvador/BA em 2015. Este vírus foi gentilmente cedido pela Profa. Silvia Sardi da Universidade Federal da Bahia (UFBA). O genoma completo do vírus foi sequenciado e depositado no GenBank, podendo ser acessado através do número de acesso: KX520666. O estoque do vírus foi obtido através de uma passagem única em células Vero e 3 passagens consecutivas em célula de mosquito da linhagem C6/36. As linhagens de células foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A quantificação viral do estoque foi realizada a partir do ensaio de placa descrito posteriormente neste projeto. Todos os estoques virais e amostras destinadas a quantificação de vírus foram armazenadas à -80ºC.

Camundongos machos e fêmeas da linhagem **A129**, deficientes para o receptor de interferons do tipo I (IFNα/βR$^{-/-}$), foram infectados com 4x10^3 unidades formadoras de placa (PFU) de ZIKV HS-2015-BA-01 pela via intravenosa (caudal). O grupo controle recebeu salina e em ambos os grupos foram administrados 200 µL. Esses animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: MOCK (controle), infectados 3 (IFNα/βR$^{-/-}$ 3 Dias (3 dpi)) e 5 dias (IFNα/βR$^{-/-}$ 5 Dias após a infecção (5 dpi)) por ZIKV.

Camundongos fêmeas prenhes da linhagem **C57BL/6**, que receberam injeção de PBS ou 1×10⁶ PFU/animal da amostra de ZIKV (HS-2015-BA-01). A prole foi avaliada na 12ª semana de vida.

4.3 Caracterização do estado clínico

4.3.1 Score Clínico

Com o objetivo de avaliar a morbidade causada pela infecção com ZIKV, os animais foram examinados por dois observadores independentes e às cegas. A

análise considerou quatro parâmetros: aparência do pelo (presença de piloereção), postura (se apresentava curvatura do dorso ou sinais sugestivos de dor), atividade espontânea (se estava ativo, caminhando pela caixa, ou apático) e variação de massa corporal (cálculo do percentual de perda de peso, convertida em pontuação de acordo com a gravidade: 0 ponto para ausência de alteração ou ganho de massa e até 2 pontos para perda significativa). Para cada parâmetro, os avaliadores atribuíram pontuação de 0 (ausência de sinais) a 2 (sinais graves). O resultado final correspondeu à média aritmética das avaliações dos observadores, obtida pela soma de todas as pontuações de cada parâmetro avaliado no escore, dividida pelo número total de parâmetros. As avaliações foram realizadas antes da infecção e nos dias 3 e 5 após a inoculação do vírus.

4.3.2 Avaliação da massa corporal

Os animais de todos os grupos, foram pesados antes e após a infecção por ZIKV, em 3 e 5 dias após a infecção.

4.3.3 Índice de adiposidade

Para avaliação do índice de adiposidade, os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico foram pesados e normalizados pelo comprimento da tíbia. Os valores foram expressos em percentual (%).

4.3.4 Índice de massa muscular esquelética

A massa do músculo tibial anterior foi aferida e normalizada pelo comprimento da tíbia dos animais para a obtenção desse índice.

4.3.5 Controle da ingestão de comida e água

No momento antes da infecção todos os grupos receberam a mesma quantidade de ração e água, no mesmo momento. As medidas de consumo da ração e água foram feitas no 3º e no 5º dpi dos animais controles e infectados. O consumo de ração e água foi registrado de forma cumulativa, considerando o total ingerido desde o início do experimento até o 3º dpi e até o 5º dpi. Cada animal estava sozinho na gaiola. Os valores foram expressos em percentual (%) de consumo.

4.3.6 Avaliação da glicemia

Utilizando o medidor de glicemia Accu-chek®, uma gota de sangue venoso foi coletada da cauda. Os animais não se encontravam em jejum, e todas as coletas foram feitas sempre no mesmo horário, pela manhã, nos tempos: antes da infecção e também após 3 e 5 dpi. Os valores de glicemia foram normalizados em relação à medida basal (antes da infecção), considerada como 100%. Dessa forma, os resultados foram expressos em percentual (%) do valor inicial (aferido antes da infecção).

4.4 Análise inflamatória

4.4.1 Hemograma

No momento da eutanásia, um volume de 0,5 mL de sangue foi coletado em tudo próprio, contendo EDTA. A amostra foi processada em hemocitômetro (Celltac MEK-6500K hemocytometer (Nihon Kohden), e o hemograma foi realizado. Após a realização do hemograma, o plasma foi retirado e armazenado adequadamente para análises posteriores.

4.4.2 Determinação da carga viral em amostras de sangue, coração e aorta:

A carga viral de amostras *ex vivo* foi quantificada por ensaio de placa. Os tecidos cardíacos e aórticos, separadamente, foram macerados em cadinhos de porcelana em ambiente estéril, em capela de fluxo laminar. Os produtos da maceração, bem como o plasma foram diluídos (1:10 p/v) em meio de cultura DMEM 0% e submetido a diluições seriadas de 1:10. Em experimentos *ex vivo* o sobrenadante da cultura foi diretamente direcionado às diluições seriadas. As amostras foram então depositadas em placas contendo uma monocamada de células VERO (célula imortalizada derivada das células epiteliais do rim do macaco verde africano, utilizadas para isolamento, cultivo e titulação de vírus) e mantidas a 37ºC durante a adsorção (uma hora) em estufa de CO_2 à 5%. Após esse período o sobrenadante foi descartado e a camada celular recoberta por uma solução de carboximetilcelulose (CMC 0,8%) em DMEM estéril suplementado com 10% de SFB, penicilina e estreptomicina. As placas foram mantidas a 37ºC e 5% de CO_2 por 5 dias. As placas foram então fixadas com formaldeído (10%), lavadas e coradas com cristal

violeta (1%). O número de unidades formadoras de placas (PFU) foi determinado por contagem manual de todas as placas presentes em cada poço.

4.4.3 Massa do baço

A massa do baço foi avaliada em animais MOCK e ZIKV, uma vez que este órgão é responsável por remover células sanguíneas senescentes e comprometidas, microrganismos opsonizados presentes na circulação além de iniciar as respostas imunes adaptativas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Para isso, os animais foram eutanasiados por decapitação após 3 e 5 dpi e os baços cuidadosamente coletados para a pesagem. O comprimento da tíbia foi utilizado para a normalização da massa do baço.

4.4.4 Quantificação de citocinas

A quantificação de citocinas e quimiocinas (CCL5, CCL2, IL1-β, TNF, IL-6) foi realizada no plasma, coração e aorta através do método de ELISA, 3 e 5 dias após a infecção. O plasma foi obtido a partir de centrifugação. A aorta e o coração foram homogeneizados em PBS contendo inibidor de proteases (0,1 mM fluoreto fenilmetilsulfonil, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) e 20 mM de aprotinina e 0,05% Tween 20, na proporção de 100mg de tecido para cada mL de solução, com o auxílio de um homogeneizador elétrico de tecidos. O sobrenadante foi coletado após centrifugação para dosagem de citocinas, sendo as amostras diluídas na proporção 1:2 em PBS acrescido 0,1% de albumina bovina. A quantificação foi realizada utilizando-se kits DuoSet enzyme linked immunosorbent (R&D Systems, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (pH 7,4) e sensibilizados durante 18h a 4°C. A reação foi bloqueada com PBS e 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, EUA). As amostras, os padrões e o branco (albumina 0,1%) foram adicionados aos poços da placa de 96 poços e incubados por 18h. Para detecção da reação, a incubação ocorreu com streptavidina conjugada com peroxidase (HRPStreptavidin Pharmingem – 1:4000) e a revelação foi realizada com OPD (ophenylenediamine dihidrocloride – Sigma-Aldrich, EUA). A reação foi interrompida com H_2SO_4 e a absorbância medida em leitor de ELISA em 492 nm. A concentração das citocinas foi determinada pelo método de ELISA. Para cada ensaio, foi construída uma curva padrão com

concentrações conhecidas do analito de interesse, fornecidas pelo kit. A absorbância das amostras foi comparada com a curva, permitindo interpolar os valores de concentração. Esses resultados foram então normalizados pela quantidade de tecido utilizada, sendo expressos em pg/100 mg de tecido. Já para as amostras de plasma, os níveis foram expressos em pg/ml.

4.4.5 Análise de permeabilidade vascular por azul de Evans

Os animais dos diferentes grupos receberam 100 µL da solução de Azul de Evans (0,5% p/v) por via intravenosa (i.v.) na veia caudal 30 minutos antes do procedimento de eutanásia. Os animais foram eutanasiados por sobredosagem de anestésico (cetamina/xilazina) e realizada laparotomia mediana. Em seguida, eles passaram por uma perfusão transcardíaca através do ventrículo esquerdo com PBS (1X), por um período de 10 minutos, utilizando uma bomba de perfusão para remoção do corante circulante. Os órgãos de interesse (cérebro, pulmões, coração e rins) foram coletados cuidadosamente, secos para remoção do excesso de PBS e transferido para a placa de Petri previamente pesada. As amostras foram mantidas em estufa a 37°C por 12 a 24 horas (overnight) até a completa secagem.

Após a secagem, as placas contendo os tecidos foram novamente pesadas em balança analítica. O peso do tecido seco foi calculado pela diferença entre o peso total (placa + tecido seco) e o peso da placa vazia. Foi adicionado 1 mL de formamida (99% pureza) em cada placa contendo o tecido seco. As amostras foram mantidas em local seco e escuro a 37°C por 24 horas para extração do corante Azul de Evans. Ao final do período de incubação, o sobrenadante (formamida contendo o Azul de Evans extraído) foi cuidadosamente coletado e transferido para placas de 96 poços para análise quantitativa. A absorbância foi lida em leitor de ELISA (620 nm). A concentração de Azul de Evans no tecido foi calculada a partir de uma curva padrão previamente preparada. Como controle branco, utilizou-se água destilada. Os resultados foram expressos em concentração de Azul de Evans (µg/mL) normalizada pelo peso do tecido seco.

4.5 Análise do impacto renal

4.5.1 Análise da função renal

Os níveis de creatinina foram determinados no plasma, pelo método de Jaffé, utilizando o kit Labtest (ref. 35-100). A dosagem de ureia plasmática foi realizada pelo método colorimétrico com urease, utilizando o kit Labtest (ref. 27). Os resultados de ambos foram expressos em mg/dL.

4.5.2 Análise histológica e histomorfométrica do tecido renal

As análises histológicas e histomorfométricas foram realizadas conforme descrito anteriormente (FARIAS et al., 2023; LANDGRAF et al., 2014; PERUCHETTI et al., 2021). Amostras de tecido renal foram seccionadas longitudinalmente, o tecido fixado por 24 horas em paraformaldeído 4% e então transferido para o álcool 70%. Posteriormente, as amostras foram embebidas e emblocadas em parafina, preparadas lâminas contendo cortes histológicos de 5 µm espessura e, posteriormente, o procedimento de coloração dos cortes com PAS (ácido periódico-reagente de Shiff) e com Picrosirius red no Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG. Foram adquiridas 15 imagens aleatórias, por animal, utilizando o microscópio óptico Zeiss (AxioCam M2, Carl Zeiss, Jena, Germany). Para análise de potenciais lesões na estrutura do tecido renal (glomérulo e túbulos) foram utilizadas as imagens de tecido corados com PAS. A quantificação de diferentes parâmetros foi realizada usando o software Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Os seguintes parâmetros de estrutura glomerular foram analisados: (1) deposição de matriz mesangial (áreas coradas com PAS normalizado pela área do tufo glomerular); (2) área do tufo glomerular (normalizada pela área glomerular total) e (3) área do espaço da cápsula de Bowman (normalizada pela área glomerular total). Os seguintes parâmetros de estrutura tubular foram analisados: (1) número de células intersticiais e (2) número de células epiteliais tubulares proximais renais (PTECs). Para análise de fibrose foram utilizados cortes histológicos de rim corados com Picrosirius red. A análise da densidade de fibras colágenas foi determinada utilizando o software Image Pro-Plus version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Os seguintes parâmetros foram analisados: (1) deposição de colágeno total e (2) deposição de colágeno tubular. Todo o

procedimento de aquisição de imagens e análises via software foram realizadas de forma duplo cego (L.B.F.O. e M.R.C.) para evitar possível viés de análise.

4.6 Análises dos parâmetros cardiovasculares

4.6.1 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca não invasiva

Com o objetivo de verificar se a infecção aguda por ZIKV causa alteração de pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) dos animais dos grupos controle (MOCK) e infectados, esses parâmetros foram aferidos antes e 3 e 5 dias após a infecção por ZIKV. A medida da pressão arterial foi realizada de maneira indireta, por pletismografia de cauda (LE 5002 – Storage Pressure Meter - Panlab). A cauda do animal foi exposta a uma lâmpada de luz infravermelha que favorece a dilatação dos vasos sanguíneos, facilitando a identificação da pulsação pelo transdutor de pressão. Após esse procedimento, a cauda foi inserida em um cuff que ao ser acionado, infla e a pressão sanguínea foi identificada pelo transdutor de pressão. Foram realizadas cinco medidas por animal das quais se obteve a média aritmética.

4.6.2 Eletrocardiografia

O eletrocardiograma (ECG) foi realizado *in vivo*, de forma não invasiva utilizando o eletrocardiógrafo InCardio (Inpulse Animal Health) em animais acordados. As mensurações foram realizadas no próprio software do aparelho. Os animais foram mantidos em decúbito dorsal e em seguida o ECG e a frequência cardíaca (FC) foram monitorados durante um período contínuo de 05 minutos por um amplificador de ECG, através do posicionamento dos eletrodos sobre a pele dos membros. Dessa forma foi possível estudar o ECG em seis derivações: D1, D2, D3, aVR, aVL, aVF e com velocidade de 50 mm/s e calibração de 10 mm/Mv, calibração do sinal: N. Para análise, utilizou-se a derivação D2, considerada a mais adequada para avaliação de ritmo e intervalos cardíacos em roedores.

4.6.3 Determinação quantitativa da atividade da isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB)

A atividade da isoenzima CK-MB foi determinada por método cinético ultravioleta (UV), no plasma, utilizando o kit comercial CK-MB Liquiform (Labtest Diagnóstica, Brasil, Ref.:118), conforme as instruções do fabricante. Utilizou-se seringas com EDTA para coletar sangue por meio de punção cardíaca. As amostras foram centrifugadas a 3.500 RPM por 10 minutos a 4°C. A absorbância foi lida a 340nm (37°C) e os resultados foram expressos como atividade da CK-MB (U/L).

4.6.4 Análise da função do coração por Langendorff

Para avaliar a função cardíaca, *ex vivo*, foi utilizada a técnica de Langendorff com fluxo constante (BELL; MOCANU; YELLON, 2011; OLEJNICKOVA et al., 2015). O coração foi isolado e conectado a um sistema de perfusão com uma solução de nutrição de Krebs-Henseileit (mmol/L) (NaCl 113,00, KCl 4,70, KH_2PO_4 1,10, $MgCl_2.6H_2O$ 1,10, $NaHCO_3$ 22,00, $C_6H_{12}O_6$ 11,00, $CaCl_2$ 1,35).

Para isso, os animais foram eutanasiados por decapitação 10 minutos após aplicação de heparina (1000 UI/kg; i.p.) (Herr et al., 2015). A cavidade torácica foi exposta e os corações retirados e colocados em uma placa de Petri contendo solução nutridora em temperatura de aproximadamente 4ºC. Em seguida, a aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação e fixada a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão que leva a solução nutridora às artérias coronarianas.

Os corações foram perfundidos com solução nutridora, gaseificada com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), com fluxo constante de 3 mL/min e temperatura de 36,5ºC. Para analisar os parâmetros de contratilidade, o átrio esquerdo foi retirado e um balão de látex conectado a um transdutor de pressão introduzido na câmara do ventrículo esquerdo. Depois de introduzido, o balão foi inflado até atingir uma pressão de 10 mmHg (pré-carga). As preparações cardíacas permaneceram 30 minutos estabilizando e, a seguir, os valores basais de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), a frequência cardíaca e a dP/dt (razão da derivada da pressão pela derivada do tempo) positiva e negativa foram registrados pelo transdutor de pressão acoplado ao balão inserido na câmara ventricular esquerda. Em seguida, curvas dose-

resposta para isoprenalina (10^{-10} mol/L a 10^{-5} mol/L) foram realizadas e os valores registrados. Os registros foram realizados utilizando o software AQCAD 2.2.4 e interpretados através do software ANCAD.

4.6.5 Isolamento dos cardiomiócitos ventriculares

Os animais foram heparinizados (8000/kg, i.p.), como descrito por Shioya (2007) e, após 10 minutos, foram eutanasiados, sendo o coração rapidamente dissecado e canulado em um sistema Langendorff de pressão constante através do tronco aórtico. Uma solução de nutrição de CIB (do inglês, cell isolation buffer, contendo, em mmol/L: 130 NaCl; 5,4 KCl, 0,5 $MgCl_2$; 0,33 NaH_2PO_4; 22 $C_6H_{12}O_6$; 25 HEPES) isenta de cálcio o que é garantido pela adição de EGTA (0,4 mmol/L) foi perfundida através do sistema coronariano de maneira retrógrada por 2 a 5 minutos, no intuito de remover o sangue presente nas coronárias e nas câmaras cardíacas. Em seguida, o coração foi perfundido por 5 minutos com a solução CIB (sem EGTA) acrescida dos seguintes componentes: 0,3 mmol/L de $CaCl_2$; 0,8 mg/mL de colagenase do tipo II; 0,06 mg/mL de proteinase tipo XXIII e 0,06 mg/mL de tripsina.

Após essa etapa inicial denominada digestão enzimática, os corações foram seccionados, retirando apenas o ventrículo esquerdo, que foi imediatamente transferido para uma segunda solução de CIB (sem EGTA), com a mesma quantidade das enzimas supracitadas, porém contendo 0,7 mmol/L de $CaCl_2$, durante 7 minutos e mantida aquecida à 37 °C.

O ventrículo esquerdo presente na solução, foi mecanicamente agitado utilizando pipeta de transferência. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em uma malha 200 µm e centrifugado a 1000 rpm por 20 segundos em temperatura ambiente. O sobrenadante dessa solução foi descartado e o pellet de células ressuspendido em solução CIB contendo 1,3 mmol/L de $CaCl_2$ e 2 mg/mL de albumina sérica bovina. Após 10 min em repouso a solução foi novamente centrifugada e o pellet ressuspendido em solução de Tyrode (contendo, em mmol/L: 140 NaCl; 5,4 KCl; 0,5 $MgCl_2$; 0,33 NaH_2PO_4; 11 $C_6H_{12}O_6$; 5 HEPES e 1,8 $CaCl_2$), onde as células foram mantidas por até 5h, em temperatura ambiente, para realização dos experimentos (SHIOYA, 2007).

4.6.6 Contratilidade de cardiomiócitos

Para a análise da contração das células cardíacas, os cardiomiócitos ventriculares isolados foram colocados em uma lamínula acoplada a uma câmara contendo um par de eletrodos paralelos que estimulam eletricamente, a 60V, pulsos bifásicos em 1Hz, por 4 ms, com o objetivo de promover a contração celular, como descrito por Joviano-Santos et al. (2016). Ao longo do experimento as células foram mantidas em solução de Tyrode, à temperatura ambiente (25°C / 30°C), sendo monitoradas através de uma câmera CCD MCS100 (IonOptix, Milton, MA, EUA). As imagens adquiridas foram usadas para analisar o encurtamento do cardiomiócito (índice de contratilidade) em resposta ao estímulo elétrico utilizando um sistema de vídeo detector de bordas (Ionoptix, Milton, MA, USA) previamente calibrado para a objetiva utilizada.

O encurtamento das células foi calculado com base na mudança obtida do sistema IonWizard A / D do conversor analógico-digital de detecção de bordas. Foram utilizadas cerca de 5 a 10 contrações consecutivas para calcular a média de contração de uma determinada célula (JOVIANO-SANTOS et al., 2016).

4.6.7 Análise do transiente de cálcio dos cardiomiócitos isolados

O transiente citoplasmático de [Ca^{2+}] foi medido em cardiomiócitos incubados com Fluo-4 acetoximetil (AM 5 µmol/L) por 30 minutos a 20–25°C em solução de Tyrode. Após a incubação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em solução de Tyrode. A aquisição das imagens dos transientes de cálcio foi realizada utilizando um microscópio confocal LSM 880 ZEISS (Carl Zeiss, Alemanha) no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI - ICB - UFMG). Durante os registros, os cardiomiócitos foram estimulados a uma frequência de 1 Hz com pulsos bifásicos de 60V por 4 ms de duração. A excitação do fluoróforo foi feita com um laser de argônio (488 nm) e a luz emitida foi lida a 505 nm por um tubo fotomultiplicador. A linha de varredura (definida em 512 pixels) foi posicionada ao longo do eixo transversal, evitando as regiões nucleares. A resolução espacial variou de 0,1 a 0,3 µm por pixel e a resolução temporal foi ajustada para 1,62 ms /linha. Os transientes de Ca^{2+} foram analisados a partir da média do sinal de Fluo-4 ao longo de toda a largura da célula e foram apresentados como fluorescência normalizada e com fundo subtraído (F/Fo). O atraso na liberação de Ca^{2+} (delay) e outros parâmetros de

sinalização de Ca^{2+} ao longo do eixo transversal do cardiomiócito foram avaliados utilizando um script personalizado em Python, que quantificou o tempo para atingir metade da fluorescência máxima para cada pixel.

O estímulo elétrico de 1Hz foi aplicado para induzir os transientes de $[Ca^{2+}]i$. A aquisição dos sinais de $[Ca^{2+}]i$ foi realizada no modo de varredura em linha do microscópio confocal (1,84 ms/linha) na região central do miócito, excluindo áreas nucleares. As variações na fluorescência (F) foram normalizadas pela fluorescência inicial (Fo) e expressas como F/Fo.

4.7 Reatividade Vascular

4.7.1 Montagem de preparações isoladas

Os animais foram divididos em três grupos: MOCK, infectados 3 e 5 dias. Os grupos foram eutanasiados por decapitação no tempo referente de cada infecção. A aorta torácica foi isolada e anéis de 3-4 mm de comprimento, contendo endotélio vascular e desprovidos de PVAT, foram montados entre dois ganchos de metal, sendo um deles conectado a um transdutor de força para registro da tensão isométrica e o outro fixado à cuba. As respostas de tensão isométrica foram registradas em polígrafo da AD Instruments). Os anéis foram acondicionados em câmaras para órgãos isolados contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs-Henseleit modificado com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 135,0; KCl 5,0; KH_2PO_4 1,17; $CaCl_2$ 2,5; $MgSO_4$ 1,4; $NaHCO_3$ 20,0; $C_6H_{12}O_6$ 11,0; em pH 7,4 sob gaseificação com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), a 37ºC. A tensão basal foi previamente determinada a partir de uma curva de tensão e a melhor tensão basal, para ambos os grupos de aortas, foi de 0,5 g. Os anéis de aorta foram submetidos à esta tensão basal de 0,5g por 60 minutos e neste período a tensão foi ajustada cada 15 minutos, quando necessário, bem como a solução de Krebs trocada para retirada de metabólitos teciduais e nutrição do tecido.

4.7.2 Avaliação da viabilidade vascular e da integridade endotelial

Após o tempo de estabilização, os anéis aórticos foram estimulados com cloreto de potássio (KCl – $9x10^{-2}$ mol/L) para determinar se a musculatura lisa estava preservada, confirmando assim a viabilidade das preparações. A presença de endotélio funcional foi verificada pela adição de acetilcolina (ACh - EC_{50}: 10^{-6}mol/L)

após pré-contração induzida por fenilefrina (PE – EC_{50} 10^{-7}mol/L). A integridade da camada endotelial foi considerada em preparações que apresentaram, no mínimo, 80% de relaxamento para acetilcolina.

4.7.3 Caracterização da contração em anéis de aorta com endotélio:

Avaliar se a infecção por ZIKV altera o perfil de contração vascular, em aortas de camundongos, na presença de endotélio. Para a caracterização das respostas vasculares apresentadas pelos grupos experimentais, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para cloreto de potássio, agente despolarizante, vasoconstritor receptor independente (KCl: 0,01 a 0,12 mol/l). E também para fenilefrina, agonista do receptor α1 adrenérgico (PE: 10^{-10} - 10^{-4} mol/L), vasoconstritor dependente de receptor. Os resultados referentes à reatividade vascular foram registrados em gramas (g) e, para padronização, convertidos em milinewtons (mN) mediante multiplicação dos valores em gramas pelo fator de conversão 9,80665.

4.7.4 Caracterização da contração em anéis de aorta na ausência de endotélio:

Avaliar o papel da camada endotelial na reatividade aórtica de animais infectados ou não por zika. O endotélio foi removido mecanicamente por atrito entre as paredes internas do vaso e um dos ganchos metálicos, já previamente inserido no lúmen do anel aórtico. Após o período de estabilização, foi realizado o teste de integridade endotelial, em que a ausência do endotélio foi considerada para aortas que apresentaram no máximo 20% de relaxamento para ACh. Uma vez confirmada a ausência de endotélio, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

4.7.5 Estudo dos mecanismos envolvidos na contração em anéis de aorta com endotélio:

A partir da avaliação dos resultados obtidos na caracterização contrátil, investigamos os mecanismos moleculares envolvidos na mediação das respostas contráteis. Para isso, curvas para PE foram realizadas em anéis na presença de endotélio e na presença de algumas ferramentas farmacológicas com intuito de avaliar, nas respostas de contração, o envolvimento de fatores como: ativação das

enzimas NO sintase (L-NAME - 10^{-4} mol/L, inibidor não seletivo de NOS), ciclooxigenase (COX) (Mofezolac - 10^{-6} mol/L - inibidor seletivo de COX-1) e Celecoxibe 10^{-6} mol/L – inibidor seletivo de COX-2), e de prostanóides vasodilatadores, como prostaciclina, utilizando o antagonista do receptor desse prostanoide (RO1138452 - 10^{-6} mol/L), antagonista do receptor CCR5 (Maraviroc – $4x10^{-5}$ mol/L) e inibidor da proteína quinase A – PKA (KT-5720 - 10^{-6} mol/L).

4.7.6 Impacto da infecção congênita por ZIKV na reatividade vascular

Avaliar se a infecção congênita por ZIKV altera o perfil de contração vascular, em aortas de camundongos (prole) machos e fêmeas, na presença de endotélio. Infecção congênita: Camundongos fêmeas C57BL/6 grávidas receberam, PBS ou $1x10^6$ PFU/animal de uma amostra de ZIKV (HS-2015-BA-01). A infecção ocorreu no 5º dia após o acasalamento. E a prole foi avaliada na 12ª semana de vida - aprovação do Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Minas Gerais sob o número CEUA (319/2022). Todo o protocolo de avaliação da viabilidade vascular e da integridade endotelial foi realizado como citado anteriormente no tópico 4.7.

Para a caracterização das respostas vasculares apresentadas pelos grupos experimentais, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para fenilefrina (PE: 10^{-10} - 10^{-4} mol/L), vasoconstritor dependente de receptor.

4.8 Análise estatística

Os gráficos e análises estatísticas gerados pelos resultados foram feitos no programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Corporation, versão 8.0.2). Inicialmente, a distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As curvas foram plotadas e, consequentemente, a EC_{50} (concentração que induz 50% da resposta) e o efeito máximo (Emax) determinados utilizando o método de regressão não linear dos mínimos quadrados (MEDDINGS; SCOTT; FICK, 1989). Para a análise da potência do agonista, foram utilizados os valores de pD_2, (-log EC_{50}), expressos como a média ± erro padrão da média (EPM), os quais foram comparados, para mais de dois grupos, por meio da análise de variância (ANOVA) de uma, duas ou três vias seguida do pós-teste de Sidak ou Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p<0,05$.

5. Resultados

5.1 Caracterização do estado clínico

5.1.1 Score Clínico

O resultado de *score* clínico mostrou que os animais infectados por ZIKV, no terceiro e quinto dia de infecção, apresentam sinais clínicos mais graves quando comparados ao controle. No 5º dpi, em comparação ao 3º dpi, a pontuação foi ainda mais elevada. Essa pontuação elevada do *score* clínico está diretamente relacionada à piora do quadro clínico, confirmando, portanto, a piora dos aspectos clínicos no grupo ZIKV quando comparado ao grupo MOCK, como visualizado na figura 5 A [MOCK 3D: 0,19 ± 0,06 (n=11); MOCK 5D: 0,85 ± 0,32 (n=13). ZIKV 3D: 3,92 ± 0,51 (n=16); ZIKV 5D: 4,84 ± 0,49 (n=16)].

5.1.2 Avaliação da massa corporal

A massa corporal foi avaliada após 3 e 5 dpi. Já no terceiro dia, a infecção por ZIKV causou uma perda de massa de aproximadamente 9%. Essa perda foi ainda superior no quinto dia após a infecção (aproximadamente 20%), como pode ser visualizado na figura 5 B [Valor em %: MOCK 3D: 102,9 ± 0,84 (n=14); MOCK 5D: 102,9 ± 0,80 (n=12). ZIKV 3D: 91,2 ± 0.99 (n=13); ZIKV 5D: 80,9 ± 0,97 (n=14)].

5.1.3 Avaliação da massa do músculo tibial anterior e índice de adiposidade

Para investigar se a perda de massa corporal observada em animais infectados por ZIKV foi acompanhada de perda de massa muscular ou de tecido adiposo, foi realizada a avaliação da massa do músculo tibial anterior e do índice de adiposidade. Apesar do animal perder 10% do peso em 3 dpi e 20% em 5 dpi, não foi detectado diferença estatística entre a massa muscular dos grupos, indicando que não houve perda de massa magra. [Valor em mg/mm: MOCK 3D: 1,58 ± 0,12 (n=05); MOCK 5D: 1,88 ± 0,19 (n=08). ZIKV 3D: 1,34 ± 0,16 (n=10); ZIKV 5D: 1,56 ± 0,08 (n=13)] (Figura 5 C).

Apesar da perda de massa corporal não ter sido justificada pela perda de massa magra, observou-se uma redução significativa no índice de adiposidade, normalizado pela tíbia do animal, nos animais infectados 3 e 5 dpi, quando comparados aos

animais controles. [Valor em %: MOCK 3D: 3,06 ± 0,27 (n=07); ZIKV 3D: 2,12 ± 0,17 (n=04); MOCK 5D: 2,74 ± 0,15 (n=08); ZIKV 5D: 2,05 ± 0,27 (n=06)] (Figura 5 D).

Esses achados sugerem a possibilidade de que a redução da massa corporal e do índice de adiposidade possa estar relacionada a alterações no estado clínico dos animais, como por exemplo mudanças na ingestão alimentar, que serão avaliados a seguir.

5.1.4 Avaliação da ingestão e glicemia

Os animais infectados apresentaram baixa procura por alimento no 3º e 5º dpi [Valor em % de ingestão comida: MOCK 3D: 10,41 ± 1,05 (n=15); MOCK 5D: 20,62 ± 3,49 (n=08). ZIKV 3D: 1,83 ± 2,42 (n=10); ZIKV 5D: 6,02 ± 0,23 (n=05)] (Figura 5 E). Com relação a ingestão de água houve redução somente no 5º dpi [Valor em % de ingestão água: MOCK 3D: 5,88 ± 0,70 (n=11); MOCK 5D: 11,76 ± 1,43 (n=06). ZIKV 3D: 5,15 ± 0,52 (n=10); ZIKV 5D: 6,67 ± 0,67 (n=03)] (Figura 5 F).

Confirmando a hipótese que a piora clínica desencadeada pela infecção com ZIKV impactou a ingesta de ração e água e que quadros infecciosos podem alterar a glicemia dos animais, investigou-se se houve também alteração dos níveis glicêmicos dos animais infectados por ZIKV. Em animais infectados com ZIKV observou-se um quadro de hipoglicemia no 3 dpi que se manteve até o 5 dpi, como pode ser visualizado na figura 5 G [Valor em %: MOCK 3D: 98,26 ± 6,05 (n=09); MOCK 5D: 131,02 ± 9,40 (n=06). ZIKV 3D: 75,37 ± 3,80 (n=13); ZIKV 5D: 70,33 ± 9,64 (n=09)].

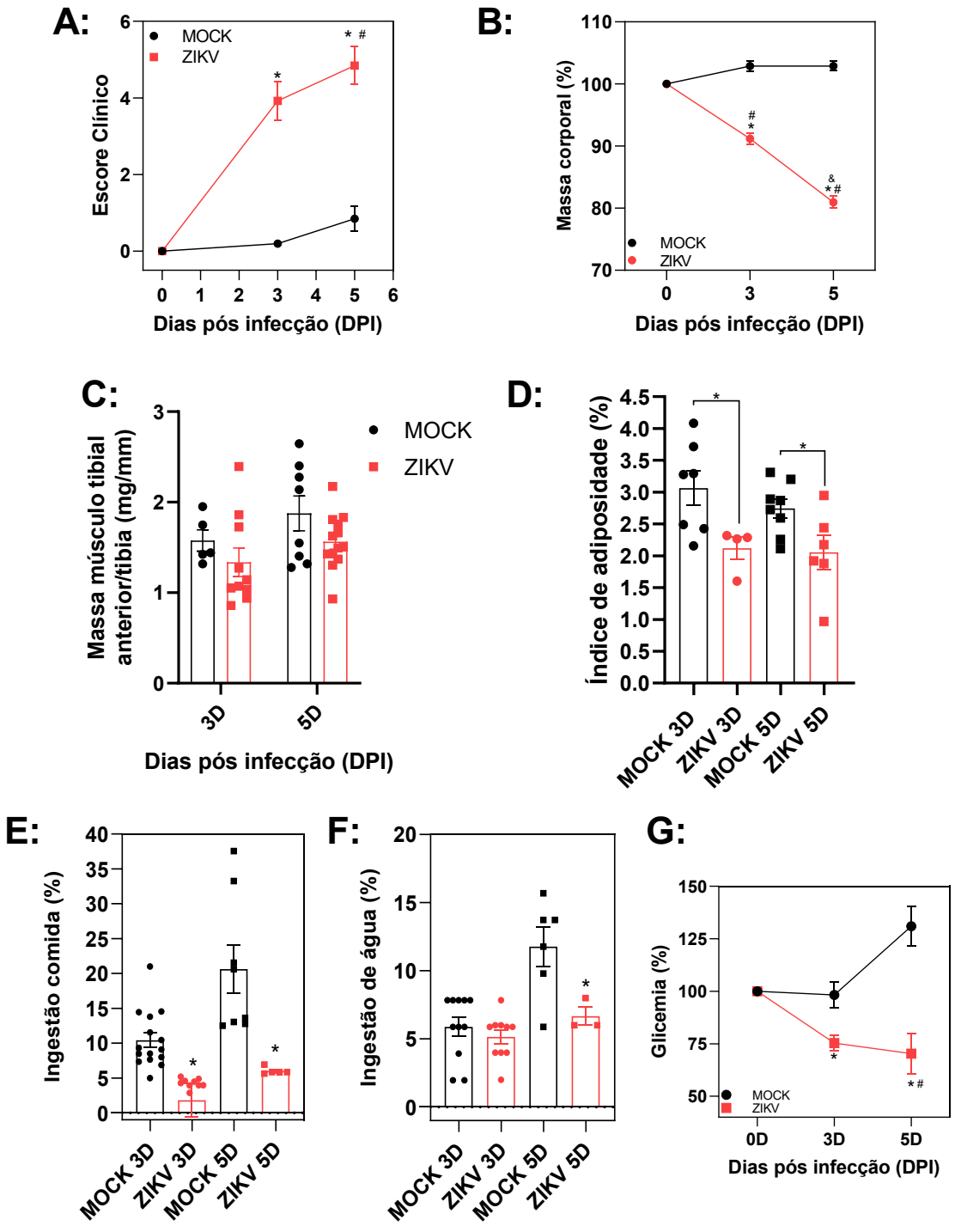


Figura 5: Caracterização do estado clínico dos animais infectados ou não por ZIKV. A: Escore clínico. O gráfico avalia os parâmetros para predição de piora clínica dos grupos MOCK, ZIKV 3 e 5D. (MOCK 3D: n=11; MOCK 5D: n=13; ZIKV 3D: n=16; ZIKV 5D: n=16). **B:** Massa corporal. Avaliação da massa corporal entre os grupos MOCK e ZIKV (MOCK 3D: n=14; MOCK 5D: n=12; ZIKV 3D: n=13; ZIKV 5D: n=14). **C:** Massa do músculo tibial

anterior corrigido pelo comprimento da tíbia. O gráfico apresenta a massa do músculo tibial, expressa em miligramas/milímetros, permitindo a comparação entre os grupos analisados e a avaliação do impacto da infecção sobre a massa muscular (MOCK 3D: n=05; MOCK 5D: n=08; ZIKV 3D: n=10; ZIKV 5D: n=13). **D:** Índice de adiposidade. Avaliação da relação entre a massa da gordura corporal e o comprimento da tíbia, expressa em percentual. Os valores permitem a avaliação do acúmulo ou perda de tecido adiposo (MOCK 3D: n=07; MOCK 5D: n=10; ZIKV 3D: n=04; ZIKV 5D: n=06). **E-F** Ingestão cumulativa de comida e água até o 3º e 5º dias pós-infecção (dpi), respectivamente. Os resultados permitem verificar alterações no consumo alimentar e hídrico decorrentes da infecção. (Ingestão comida: MOCK 3D: n=15; MOCK 5D: n=08; ZIKV 3D: n=10; ZIKV 5D: n=05). Ingestão água: MOCK 3D: n=11; MOCK 5D: n=06; ZIKV 3D: n=10; ZIKV 5D: n=03). **G:** Glicemia. Os resultados mostram alterações no controle glicêmico em animais infectados com ZIKV. Os valores de glicemia foram normalizados em relação à medida basal (antes da infecção), considerada como 100%. Os resultados foram expressos em percentual (%) do valor inicial. (MOCK 3D: n=09; MOCK 5D: n=06. ZIKV 3D: n=13; ZIKV 5D: n=09). Cada círculo/barra representa a média ± EPM da massa corporal obtida para MOCK e ZIKV. *representa diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao grupo Mock. # em relação ao grupo ZIKV 5DPI X 3DPI. & em relação ao grupo ZIKV infectado x antes da infecção (0DPI).

5.2 Análise inflamatória

5.2.1 Hemograma

Após 5 dias de infecção por ZIKV a contagem global de leucócitos estava aumentada quando comparado ao controle e ao grupo ZIKV 3D (Figura 6 A) [Valor em 10^3/µL - MOCK 3D: 8,46 ± 1,39 (n=08); MOCK 5D: 8,28 ± 1,53 (n=17); ZIKV 3D: 9,90 ± 1,18 (n=13) e ZIKV 5D: 27,70 ± 3,08 (n=17)]. Esse aumento se deve principalmente ao aumento na contagem de monócitos (Figura 6 B) [Valor em 10^3/µL - MOCK 3D: 0 (n=08); MOCK 5D: 0,08 ± 0,04 (n=17); ZIKV 3D: 0,32 ± 0,04 (n=13) e ZIKV 5D: 0,90 ± 0,12 (n=19)] e granulócitos (Figura 6 C) [Valor em 10^3/µL - MOCK 3D: 4,20 ± 0,90 (n=08); MOCK 5D: 3,18 ± 0,46 (n=17); ZIKV 3D: 5,83 ± 0,90 (n=13) e ZIKV 5D: 23,67 ± 2,37 (n=19)], mas sem alteração na contagem de linfócitos (Figura 6 D) [Valor em 10^3/µL - MOCK 3D: 4,26 ± 0,54 (n=08); MOCK 5D: 4,04 ± 0,62 (n=17); ZIKV 3D: 3,65 ± 0,47 (n=13) e ZIKV 5D: 4,25 ± 0,50 (n=19)]. Além disso, foi visto uma redução no volume corpuscular médio em animais infectados (Figura 6 E) [Valor em 10^3/µL - MOCK 3D: 47,0 ± 0,36 (n=08); MOCK 5D: 47,50 ± 0,28 (n=16); ZIKV 3D: 46,60 ± 0,36

(n=13) e ZIKV 5D: 46,64 ± 0,25 (n=19)], e um discreto aumento nos níveis de hemoglobina (Figura 6 F) [Valor em g/dL - MOCK 3D: 12,72 ± 0,73 (n=08); MOCK 5D: 13,08 ± 0,37 (n=17); ZIKV 3D: 13,26 ± 0,30 (n=13) e ZIKV 5D: 15,36 ± 0,61 (n=19)]. Não foi identificada alteração no hematócrito [Valor em % - MOCK 3D: 37,21 ± 2,35 (n=08); MOCK 5D: 39,57 ± 0,96 (n=15); ZIKV 3D: 38,95 ± 0,87 (n=13) e ZIKV 5D: 43,03 ± 1,33 (n=15)], nem nas plaquetas [Valor em 10^3/µL - MOCK 3D: 425,50 ± 44,61 (n=08); MOCK 5D: 402,67 ± 22,77 (n=15); ZIKV 3D: 346,69 ± 32.24 (n=13) e ZIKV 5D: 402,67 ± 22,77 (n=15)] (Figura 6 G-H).

5.2.2 Determinação da carga viral em amostras de aorta, coração e plasma

A presença do vírus da Zika foi detectada em ambos tecidos e plasma em 3 e 5 dpi. [Valor expresso em Log_{10}(PFU/g) - Plasma: ZIKV 3D: 6,69 ± 0,41 (n=06); ZIKV 5D: 5,57 ± 0,09 (n=06); Aorta: ZIKV 3D: 6,42 ± 0,26 (n=10); ZIKV 5D: 6,77 ± 0,17 (n=11); Coração: ZIKV 3D: 5,79 ± 0,23 (n=09); ZIKV 5D: 5,84 ± 0,24 (n=10)]. Entretanto, no plasma foi detectada diferença estatística entre os tempos de infecção, indicando no 5º dpi uma redução significativa do vírus na circulação (Figura 6 I-K).

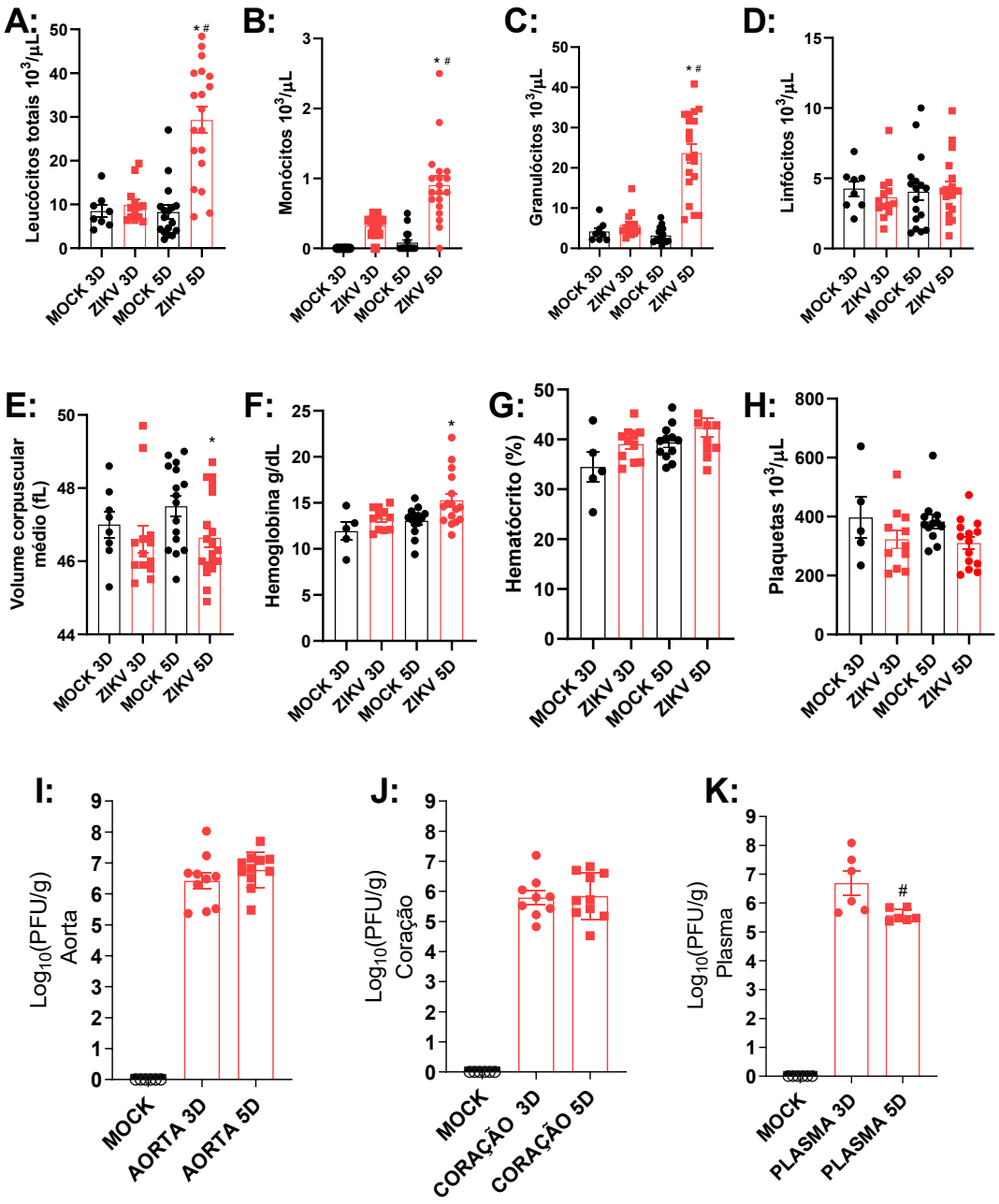


Figura 6: Efeito da infecção por ZIKV sobre os parâmetros sanguíneos e inflamatórios analisados. A: Leucócitos totais. **B:** Monócitos. **C:** Granulócitos. **D:** Linfócitos. **E:** Volume corpuscular médio (VCM). **F:** Hemoglobina. **G:** Hematócrito. **H:** Plaquetas (MOCK 3D: n=08; MOCK 5D: n=15/17. ZIKV 3D: n=13; ZIKV 5D: n=15/19). **I-K:** Determinação da carga viral em amostras de aorta, coração e plasma, respectivamente, de animais infectados 3 e 5 dpi (Plasma: ZIKV 3D: n=06 e ZIKV 5D: n=06); Aorta: ZIKV 3D: n=10 e ZIKV 5D: n=11; Coração: ZIKV 3D: n=09 e ZIKV 5D: n=10). Cada símbolo representa a média ± EPM dos resultados obtidos para MOCK e ZIKV. *representa diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao grupo MOCK e # em relação ao grupo ZIKV 3D.

5.2.3 Massa do baço

Uma outra forma de caracterizar a infecção por ZIKV foi através da medida da massa do baço, normalizado pelo comprimento da tíbia. Esse importante órgão está relacionado a processos inflamatórios, uma vez que ele retira da circulação sanguínea células senescentes e opsonizadas. A massa do baço de animais infectados estava significativamente aumentada no 3º e 5º dpi, quando comparado aos controles (Figura 7 A-B) [Valor expresso em mg/mm - MOCK 3D: 7,40 ± 1,31 (n=06); MOCK 5D: 5,99 ± 0,70 (n=10); ZIKV 3D: 12,53 ± 0,62 (n=15) e ZIKV 5D: 12,16 ± 1,35 (n=10)].

5.2.4 Dosagem de mediadores pró-inflamatórias

A dosagem de citocinas e de quimiocinas pró-inflamatórias foram realizadas no plasma, coração e aorta de animais infectados ou não. Detectou-se aumento de CCL5 e CCL2 na aorta e de CCL5 no plasma (Figura 7 C-D – Tabela 1). Não foi observada diferença estatística na concentração de IL-1β, TNF e IL-6 entre os grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1: Dosagem das citocinas CCL5, CCL2, IL-1β, TNF e IL-6 em aorta, coração e plasma de grupos controle e infectados 3 e 5 dpi.

Grupos	Tecido	CCL5	CCL2	IL-1β	TNF	IL-6	n
MOCK 3D	Aorta	ND	ND	7±3,5	ND	ND	5/6
MOCK 3D	Coração	ND	ND	12,3±4,4	ND	ND	6
MOCK 3D	Plasma	1,6±1,6	ND	ND	ND	ND	6
MOCK 5D	Aorta	0,6 ± 0,6	ND	12,8±4,8	ND	ND	6
MOCK 5D	Coração	ND	8±6,2	9,1±6,3	ND	ND	6
MOCK 5D	Plasma	ND	ND	ND	ND	ND	5/6
ZIKV 3D	Aorta	87,6± 33,9	296,8±38,2*	6,8±6,8	ND	ND	5/6
ZIKV 3D	Coração	ND	87,0±17,7	15,1±3,2	ND	ND	6
ZIKV 3D	Plasma	684,6±135,3*	44,7±16,3	0,1±0,1	ND	ND	6
ZIKV 5D	Aorta	842,6±225,8*#	264.3±62,5*	13,1±10,3	ND	ND	6
ZIKV 5D	Coração	137,0±86,7	76,0±41,4	9,3±3,5	ND	ND	5/6
ZIKV 5D	Plasma	942,6±338,5*	89,5±23,9	ND	18,2±18,2	2,2±2,22	5/6

ND – Não detectado. Os valores são expressos em pg/100 mg de tecido ou pg/mL. Os valores representam média ± SEM. A significância estatística foi determinada usando two-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. * $p < 0.05$ Controle vs. ZIKV; # em relação ao ZIKV 3D.

5.2.5 Permeabilidade Vascular

A permeabilidade vascular foi avaliada dosando o extravasamento plasmático do corante azul de Evans em órgãos importantes como cérebro, pulmão, coração e rim. A infecção pelo ZIKV gerou extravasamento do corante somente no rim, após 5 dpi, sugerindo disfunção da barreira endotelial renal (Figura 7 E – Tabela 2).

Tabela 2: Análise do extravasamento de azul de Evans nos tecidos cerebral, pulmonar, cardíaco e renal de animais controle e infectados aos 3 e 5 dias dpi, como indicador de permeabilidade vascular

Grupos	Cérebro	Pulmões	Coração	Rins	n
MOCK	4,36 ± 1,5	28,40 ± 1,6	17,20 ± 1,6	12,96 ± 2,8	4/5
ZIKV 3D	7,26 ± 2,3	36,61 ± 7,6	13,94 ± 3,4	21,90 ± 5,2	4/5
ZIKV 5D	5,71 ± 1,7	29,54 ± 13,2	19,01 ± 6,2	60,55 ± 26,8*#	3/4

Os valores são expressos em µg/100mg de tecido. Os valores representam média ± SEM. A significância estatística foi determinada usando two-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. * $p < 0.05$ Controle vs. ZIKV; # em relação ao ZIKV.

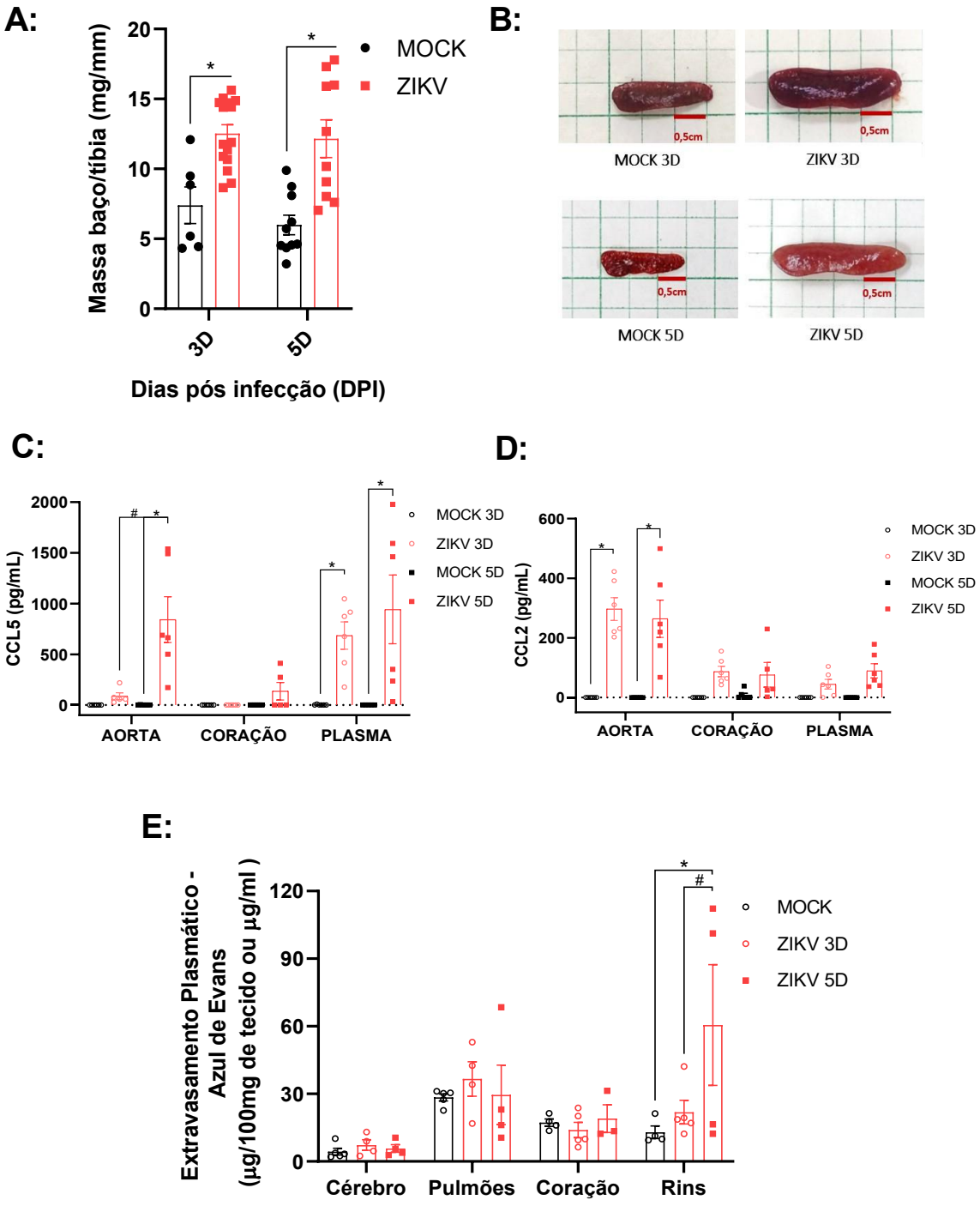


Figura 7: Efeito da infecção por ZIKV sobre os parâmetros inflamatórios analisados através da medida do baço, dosagem de quimiocinas e citocinas e extravasamento plasmático. A: Massa dos baços analisados nos grupos MOCK e infectados com 3 e 5D (n= 6-15). **B:** Imagem representativa comparando os baços de animais infectados e controles. **C-D**: Dosagem de quimiocinas envolvidas no processo inflamatório, CCL5, CCL2, respectivamente (n=5/6). **E:** Extravasamento plasmático avaliado pela permeabilidade

vascular do azul de Evans. Dados expressos em µg/100mg de tecido ou µg/ml (plasma) (n=3/5). Cada barra representa a média ± EPM dos resultados obtidos para MOCK e ZIKV. *Representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo MOCK e # em relação ao grupo ZIKV 3DPI.

5.3 Análise do impacto renal

5.3.1 Análise da função renal

Tendo como hipótese um possível dano renal pela infecção por ZIKV, devido ao aumento de permeabilidade vascular nos rins, analisou-se a função renal utilizando kits comerciais de ureia e creatinina. Observou-se um aumento na dosagem de creatinina, mas não ureia, somente no 3º dpi (Figura 8 A-B). Curiosamente, observou-se aumento de creatinina plasmática no grupo MOCK 5D em comparação ao MOCK 3D. [Valor expresso em mg/dL: Creatinina - MOCK 3D: 0,45 ± 0,08 (n=07); MOCK 5D: 0,61 ± 0,04 (n=06); ZIKV 3D: 0,74 ± 0,07 (n=07) e ZIKV 5D: 0,53 ± 0,06 (n=10). Ureia: MOCK 3D: 48,63 ± 1,52 (n=07); MOCK 5D: 61,27 ± 6,42 (n=08); ZIKV 3D: 44,06 ± 4,00 (n=07) e ZIKV 5D: 50,33 ± 5,61 (n=11)].

5.3.2 Análise histológica e histomorfométrica do tecido renal

A infecção pelo ZIKV desencadeou uma lesão renal aguda tubular como pode ser visto devido ao aumento de creatinina plasmática além de proliferação tubular compensatória, uma vez que foi visualizado aumento de células tubulares (Figura 8 C-E): MOCK 3D: 262 ± 3,7 (n=06); ZIKV 3D: 288,2 ± 8,5 (n=07); MOCK 5D: 257,4 ± 12,6 (n=07); ZIKV 5D: 275,9 ± 14,0 (n=05) e um aumento do infiltrado inflamatório intersticial: MOCK 3D: 13,33 ± 0,7 (n=06); ZIKV 3D: 14,7 ± 0.8 (n=07); MOCK 5D: 17 ± 0,8 (n=07); ZIKV 5D: 21,3 ± 0,20 (n=05). Apesar da ocorrência de lesão renal, não se observou deposição de colágeno por meio da coloração de Picrosírius red (Figura 8 F-H). Colágeno total: MOCK 3D: 41,2 ± 4,3 (n=06); ZIKV 3D: 39,9 ± 4,7 (n=06); MOCK 5D: 35,5 ± 1.9 (n=07); ZIKV 5D: 40 ± 3,4 (n=05) e colágeno tubular: MOCK 3D: 23 ± 1,8 (n=06); ZIKV 3D: 27,3 ± 3,1 (n=06); MOCK 5D: 24,2 ± 2,3 (n=07); ZIKV 5D: 23,8 ± 4,3 (n=05).

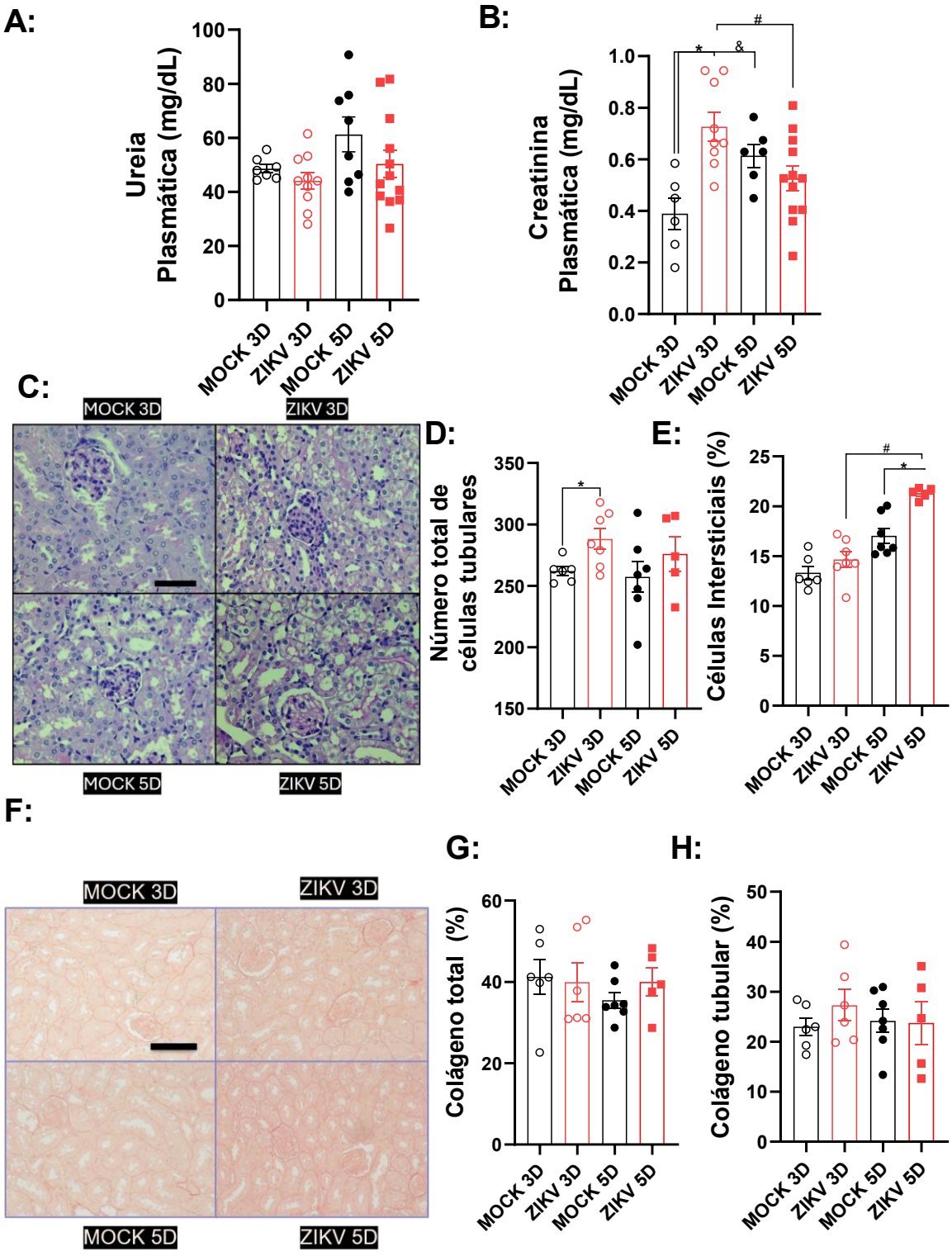


Figura 8: Efeitos da infecção por ZIKV sobre a função e morfologia renal. A: Avaliação de ureia plasmática. **B:** Avaliação de creatinina plasmática. Os dados são expressos em mg/dL. **C:** Micrografias representativas de glomérulos corticais em cortes renais corados com ácido periódico de Schiff (PAS). Barra de escala: 200 µm. **D:** Análise quantitativa da celularidade tubular. **E:** Análise quantitativa da celularidade intersticial. **F:** Micrografias

representativas de cortes renais corados com PicroSirius. Barra de escala: 200 µm. **G:** Análise quantitativa do percentual da deposição de colágeno total. **H:** Análise quantitativa do percentual da deposição de colágeno tubular. Cada barra representa a média ± EPM dos resultados obtidos para MOCK e ZIKV (n= 5-11). *Representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo MOCK, # em relação ao ZIKV 3dpi e & em relação ao MOCK X MOCK.

5.4 Análises dos parâmetros cardiovasculares

5.4.1 Registro da Pressão Arterial Sistólica (PAS) e frequência cardíaca

Os animais infectados por ZIKV se encontravam hipotensos já no 3º dpi quando comparado ao grupo MOCK (Valor expresso em mmHg - MOCK 3D: 107 ± 3 (n=17) e ZIKV 3D: 86 ± 3 (n=16)). Porém, no 5º dpi houve uma recuperação da PAS se equiparando à PAS do controle (Valor expresso em mmHg - MOCK 5D: 102 ± 1 (n=19); ZIKV 5D: 96 ± 2 (n=21)). Embora haja uma queda importante da pressão arterial sistólica, não foi observada alteração significativa na frequência cardíaca (FC), aferida por meio da eletrocardiografia (Figura 9 A-B) (Valor expresso em Batimento Por Minuto (BPM) - MOCK 3D: 487 ± 43 (n=05); MOCK 5D: 546 ± 47 (n=05); ZIKV 3D: 571 ± 23 (n=09) e ZIKV 5D: 482 ± 26 (n=10).

5.4.2 Eletrocardiografia

Ainda avaliando o sistema cardiovascular, a infecção por ZIKV causou alterações no eletrocardiograma. A figura 9 C apresenta a imagem representativa dos traçados do eletrocardiograma. As setas pretas mostram a presença de fragmentação de QRS, QRS invertido e extrassístole. Além disso, também aumentou a duração da onda P no eletrocardiograma, apenas em 5 dpi (Figura 9 D) [Valor expresso em milissegundos (ms) - MOCK 3D: 27,2 ± 3,0 (n=05); MOCK 5D: 22,0 ± 1,3 (n=05). ZIKV 3D: 23,3 ± 2,0 (n=09) e ZIKV 5D: 34,6 ± 1,6 (n=12)], mas não alterou a amplitude dessa onda. A infecção por ZIKV também gerou aumento na duração do intervalo PR (Figura 9 E) [Valor expresso em milissegundos (ms) - MOCK 3D: 34 ± 4,3 (n=05); MOCK 5D: 29,2 ± 2,3 (n=05); ZIKV 3D: 26,3 ± 2,3 (n=09) e ZIKV 5D: 41,3 ± 3,2 (n=11)] (Figura 9 D-E). Em congruência com os resultados apresentados acima, a figura 9 F, mostra o intervalo QT aumentado no grupo ZIKV 5D [Intervalo QT - Valor expresso em milisegundos (ms) - MOCK 3D: 67,60 ± 3,97 (n=05); MOCK 5D: 55,20 ± 3,83 (n=05); ZIKV 3D: 64,77 ± 2,44 (n=10); ZIKV 5D: 83,79 ± 6,75 (n=06)].

A frequência cardíaca não apresentou alteração significativa entre os grupos [Frequência cardíaca (BPM): MOCK 3D: 486,60 ± 43,01 (n=05); MOCK 5D: 546,00 ± 43,63 (n=055); ZIKV 3D: 571,00 ± 23,39 (n=09); ZIKV 5D: 481,70 ± 25,84 (n=10)].

Nos demais parâmetros do eletrocardiograma considerados clinicamente relevantes, não foram detectadas alterações significativas, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Análise dos parâmetros do eletrocardiograma de animais controle e infectados aos 3 e 5 dias dpi

Grupos	Amplitude QRS (mV)	Duração QRS (ms)	Amplitude onda T (mV)	Intervalo QTc (ms)	n
MOCK 3D	0,30 ± 0,03	41,60 ± 3,06	0,03 ± 0,02	119,40 ± 34,80	4/5
ZIKV 3D	0,17 ± 0,06	39,50 ± 3,64	0,04 ± 0,01	137,11 ± 4,39	9/10
MOCK 5D	0,23 ± 0,04	40,40 ± 2,93	-0,004 ± 0,006	146 ± 33,29	4/5
ZIKV 5D	-0,01 ± 0,13	42,83 ± 2,68	0,02 ± 0,01	120,36 ± 19,42	11

mV – Milivolts. ms - Milissegundos. Os valores representam média ± SEM. A significância estatística foi determinada usando two-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Sidak.

5.4.3 Determinação quantitativa da atividade da isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB)

Uma vez verificada alteração no eletrocardiograma de animais infectados com ZIKV, decidiu-se avaliar a ocorrência de lesão do músculo cardíaco pela quantificação do marcador CK-MB. Os níveis plasmáticos da enzima CK-MB foram aumentados significativamente somente nos animais do grupo após 5 dias de infecção. O grupo 3 dpi não apresentou diferença com relação ao grupo controle e também não foi diferente entre o grupo infectado 5 dpi [Valor expresso em U/L - MOCK: 220,1 ± 17,2 (n=03); ZIKV 3D: 250,4 ± 26,3 (n=03) e ZIKV 5D: 341,0 ± 28,0 (n=04)] (Figura 9 F).

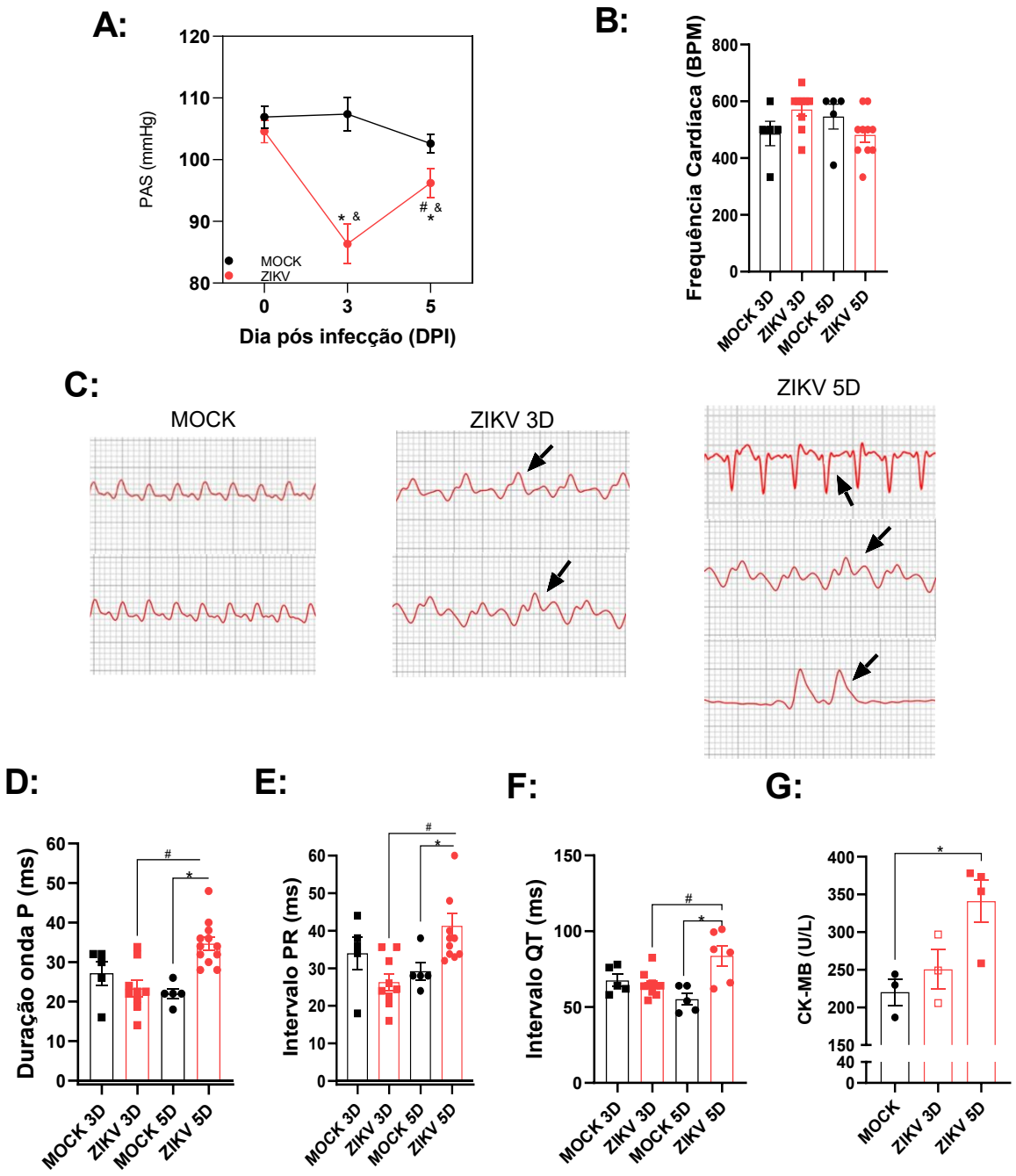


Figura 9: Efeito da infecção por ZIKV sobre os parâmetros cardiovasculares (pressão arterial sistólica, frequência e eletrocardiograma). A: Pressão arterial sistólica (PAS) (n= 16-21). **B:** Frequência cardíaca (BPM) (n= 5-10) obtida do eletrocardiograma. A pressão arterial sistólica e a frequência cardíaca foram aferidas na plestismografia de cauda. **C:** Figura representativa dos traçados do eletrocardiograma (derivação D2, velocidade de 50 mm/s, calibração 10 mm/mV, calibração do sinal: N). A figura mostra um traçado normal referente ao grupo MOCK. No traçado do grupo ZIKV 3D, as setas pretas demonstram fragmentação

do QRS indicando distúrbio de condução intraventricular. No traçado do grupo ZIKV 5D, as setas pretas mostram QRS invertido, indicativo de bloqueio de ramo direito, fragmentação de QRS e por último presença de extra-sístoles. **D:** Eletrocardiograma - Duração onda P (n= 5-12). **E:** Eletrocardiograma - Intervalo PR (n= 5-11). **F:** Eletrocardiograma - Intervalo QT (n= 5-11) **G:** Quantificação da atividade da isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB) no plasma de animais MOCK e ZIKV. Cada barra representa a média ± EPM dos resultados obtidos para MOCK e ZIKV (n=3-4). *representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo MOCK, # em relação ao grupo ZIKV 3DPI e & em relação ao momento antes da infecção.

5.4.4 Análise da função cardíaca por Langendorff

A imagem representativa na figura 10 A, demonstra que os valores basais da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) do grupo infectado por ZIKV foi significativamente maior que a obtida para o grupo controle [Valores expressos em mmHg - PDVE Basal - MOCK 3D: 39,75 ± 6,7 (n=06); ZIKV 3D: 63,37 ± 7,5 (n=07); MOCK 5D: 41,36 ± 7,7 (n=07) e ZIKV 5D: 64,18 ± 8,9 (n=06)]. O gráfico apresentado na figura 10 C demonstra que a infecção por ZIKV causou, além de aumento na PDVE no estado basal, um aumento ainda superior após desafio farmacológico com isoprenalina (agonista beta não-seletivo) tanto com 3 quanto com 5 dias [Valores expressos em mmHg - PDVE + Isoprenalina - MOCK 3D: 55,47 ± 10,11 (n=06); ZIKV 3D: 94,93 ± 8,13 (n=07); MOCK 5D: 55,22 ± 12,12 (n=07) e ZIKV 5D: 79,50 ± 12,0 (n=06)].

Em consonância com o resultado da PDVE, a razão da derivada da pressão em função da derivada do tempo (dP/dT) positiva ($dP/dT_{positiva}$) e negativa ($dP/dT_{negativa}$) se mostraram significativamente maiores já no basal, no grupo ZIKV quando comparado ao grupo controle (Figura 10 B) [Valores expressos em mmHg/s - MOCK ($dP/dT_{positiva}$ Basal - MOCK 3D: 1728,7 ± 310,3 (n=06); ZIKV 3D: 2420,8 ± 262,29 (n=07); MOCK 5D: 1732,2 ± 276,8 (n=07) e ZIKV 5D: 2721,7 ± 341,6 (n=06)] e $dP/dT_{negativa}$ Basal – [Valores expressos em mmHg/s - MOCK 3D: –1212,2 ± 256,0 (n=06); ZIKV 3D: –1761,8 ± 226,6 (n=07); MOCK 5D: –1157,1 ± 203,0 (n=07) e ZIKV 5D: –2165,8 ± 383,4 (n=06)]. Este aumento se manteve durante a curva para isoprenalina (Figura 10 D) [Valores expressos em mmHg/s - $dP/dT_{positiva}$ com Isoprenalina - MOCK 3D: 2992,1 ± 579,9 (n=06); ZIKV 3D: 5377,5 ± 390,3 (n=07); MOCK 5D 2969,7 ± 700,2 (n=07) e ZIKV 5D 4293,5 ± 659,2 (n=06)]. [Valores expressos em mmHg/s - $dP/dT_{negativa}$ com Isoprenalina - MOCK 3D: -2382,0 ± 492,7

(n=06); ZIKV 3D: -3944,4 ± 288,5 (n=07); MOCK 5D: -1946,2 ± 386,1 (n=07) e ZIKV 5D: -3539,9 ± 498,2 (n=06)]. Com estes resultados é possível afirmar que a infecção por ZIKV alterou tanto a amplitude quanto a contração dos corações de animais infectados.

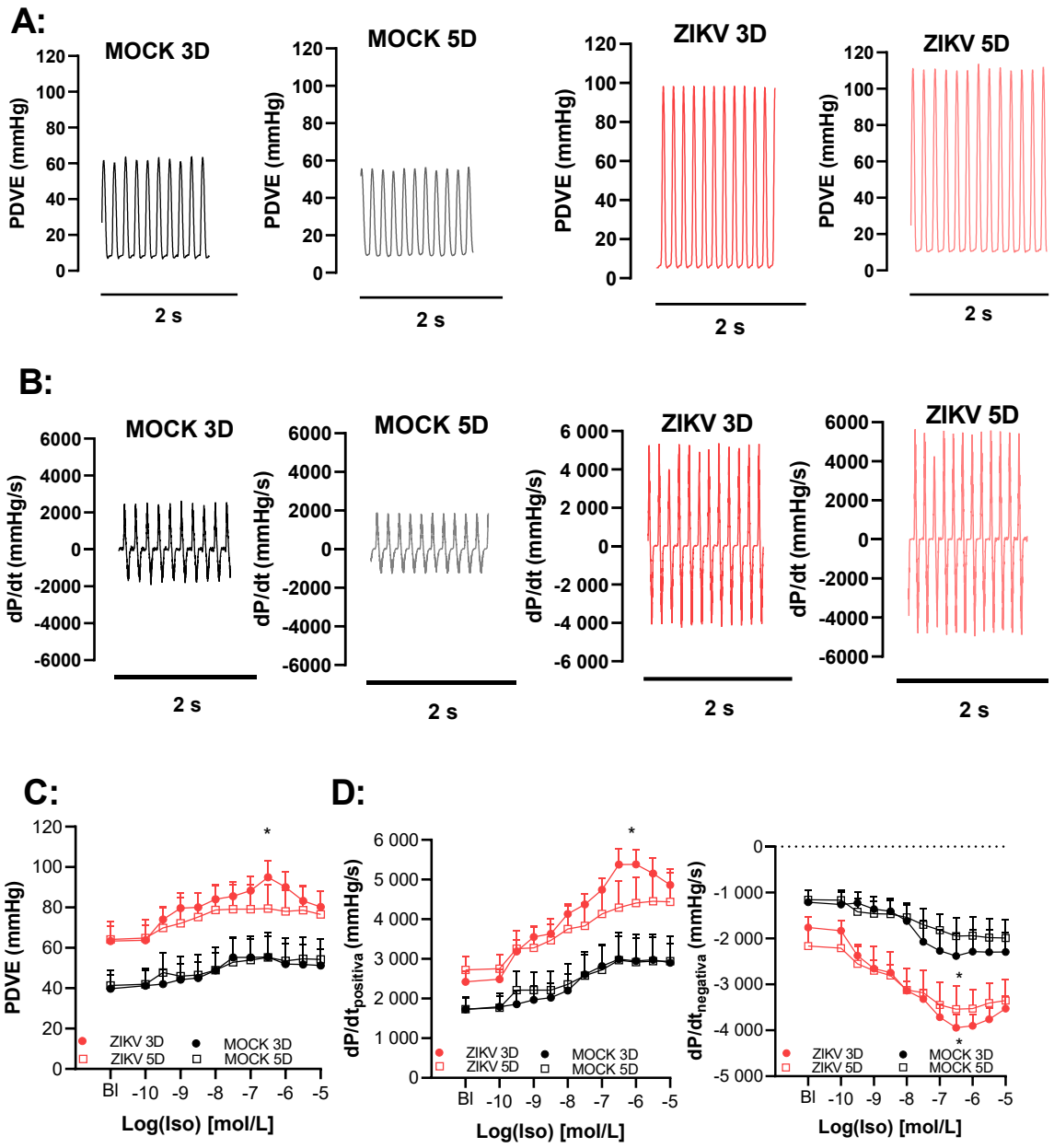


Figura 10: Efeito da infecção por ZIKV sobre a função cardíaca analisada por Langendorff. A: Traçado representativo da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) em um estado basal dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 3D e 5D (n= 6/7). **B:** Traçado representativo da derivada da pressão pela derivada do tempo (dP/dt) em um estado basal (n= 6/7). **C:** PDVE após curva cumulativa para isoprenalina (estímulo farmacológico) (n= 6/7) nos grupos MOCK, ZIKV 3D e 5D (n= 6/7). **D:** dP/dt positiva e negativa após curva

cumulativa para isoprenalina (estímulo farmacológico) nos grupos MOCK, ZIKV 3D e 5D. Cada símbolo representa a média ± EPM dos parâmetros obtidos entre os grupos supracitados. *representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao resultado observado no grupo MOCK.

5.4.5 Contratilidade de cardiomiócitos

Em congruência com os resultados da função cardíaca, os cardiomiócitos dos animais infectados apresentaram uma maior fração de encurtamento no 3º dpi e se manteve aumentado no 5º dpi quando comparado aos controles [MOCK 3D: 6,08 ± 0,49 (n=39 células); MOCK 5D: 6,98 ± 0,45 (n=48 células); ZIKV 3D: 10,34 ± 0,77 (n=49 células) e ZIKV 5D: 11,63 ± 0,52 (n=48 células] (Figura 11 A). Uma fração de encurtamento aumentada sugere uma contratilidade superior, como foi visto no teste de Langendorff (Figura 10). No entanto, o tempo que a célula cardíaca leva para atingir 50% do pico de contração não se alterou [MOCK 3D: 31,83 ± 1,04 (n=58 células); MOCK 5D: 31,870 ± 0,94 (n=38 células); ZIKV 3D: 33,14 ± 1,21 (n=53 células) e ZIKV 5D: 33,80 ± 0,90 (n=61 células)] (Figura 11 B). Já, o tempo que o cardiomiócito leva para gerar 50% do relaxamento está aumentado nas células infectadas com 3 dpi [MOCK 3D: 65,73 ± 2,34 (n=44 células) e ZIKV 3D: 78,11 ± 3,06 (n=49 células)] (Figura 11 C). Oposto ao que foi encontrado com 3 dias, a análise das células após 5 dias de infecção mostrou que o tempo que o cardiomiócito leva para ter 50% de relaxamento está semelhante ao controle [MOCK 5D: 69,13 ± 2,00 (n=53 células); ZIKV 5D: 62,13 ± 1,63 (n=59 células)].

5.4.6 Transiente de cálcio

A infecção pelo ZIKV causou um aumento dos transientes de cálcio no 3º e 5º dpi. As células dos animais infectados, 3 e 5 dpi, apresentaram uma maior amplitude da corrente de cálcio após serem estimuladas eletricamente (1Hz), quando comparada ao controle [MOCK: 2.40 ± 0.10 (n=93 células); ZIKV 3D: 3,13 ± 0,11 (n=84 células) e ZIKV 5D: 212,31 ± 5,13 (n=60 células)] (Figura 11 D).

Células de animais infectados após 5 dpi apresentaram um tempo de decaimento das concentrações de cálcio maior que às dos controles (MOCK) e infectado 3 dpi [MOCK: 191,82 ± 3,90 (n=93 células); ZIKV 3D: 187,78 ± 5,13 (n=84 células); ZIKV 5D: 3,67 ± 0,16 (n=60 células)] e também um atraso importante na

liberação de cálcio dos estoques [MOCK: 61,04 ± 1,50 (n=91 células); ZIKV 3D: 62,17 ± 1,56 (n=83 células) e ZIKV 5D: 70,12 ± 1,53 (n=58 células)] (Figura 11 E-F).

A figura 11 G ilustra o transiente de cálcio em cardiomiócitos de animais MOCK e infectados com ZIKV 3 e 5 dpi após ser estimulado com 1 Hz. Quanto, mais intensa é a coloração (próximo da cor amarela na escala), maior a liberação de cálcio pelo cardiomiócito, como foi vista no grupo ZIKV 3 e 5 dpi.

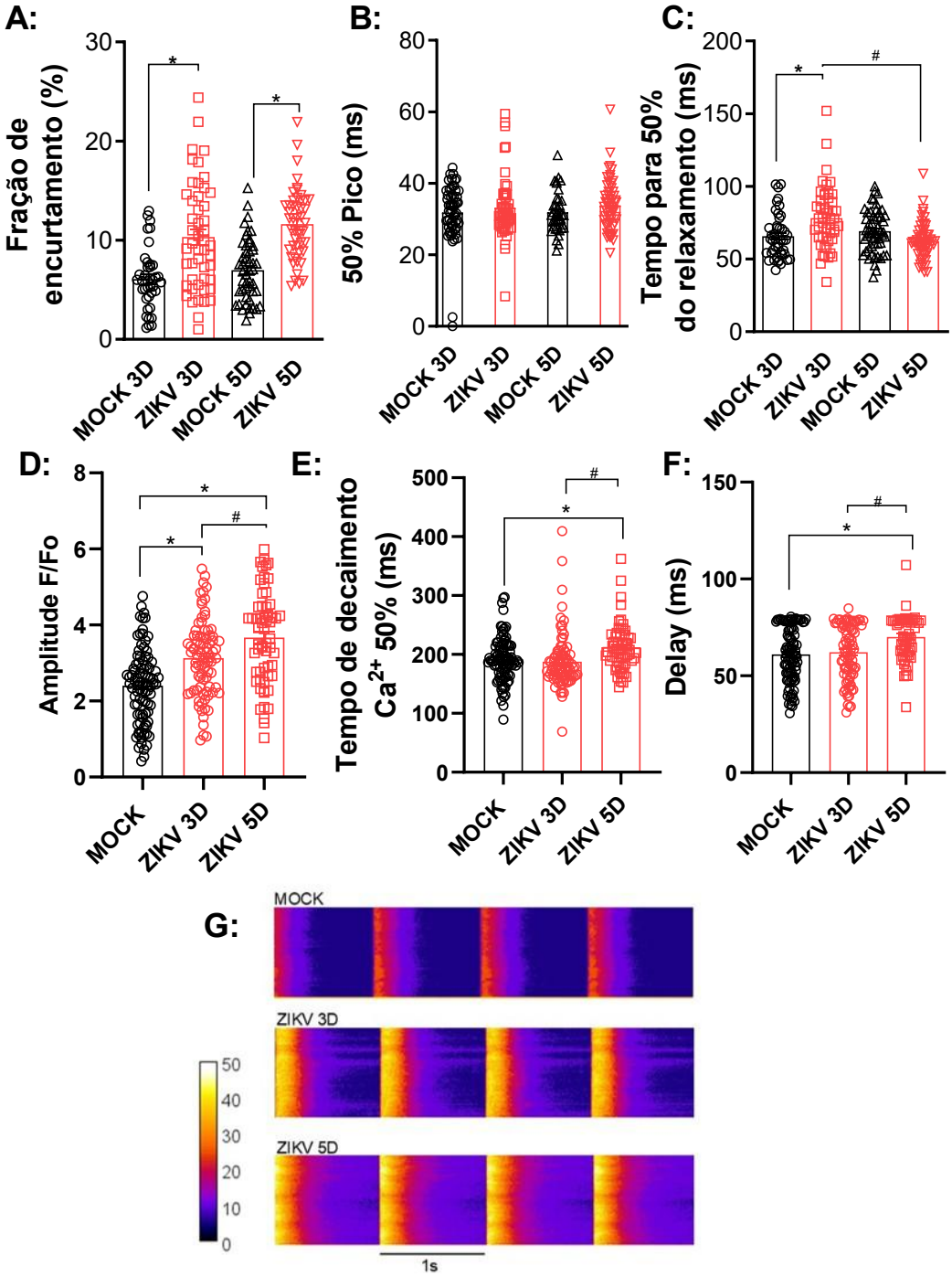


Figura 11: Efeito da infecção por ZIKV sobre a contratilidade de cardiomiócitos e transiente de cálcio. Efeito da infecção por ZIKV sobre a contratilidade dos cardiomiócitos e transiente de cálcio dos grupos MOCK e ZIKV 3D e 5D. **A:** Fração de encurtamento (MOCK 3D: n=39 células; MOCK 5D: n=48 células; ZIKV 3D: n=49 células; ZIKV 5D: n=48 células). **B:** Tempo para atingir 50% do pico máximo (MOCK 3D: n=58 células; MOCK 5D: n=38 células; ZIKV 3D: n=53 células; ZIKV 5D: n=61 células). **C:** Tempo para atingir 50% do relaxamento (MOCK 3D: n=44 células; ZIKV 3D: n=49 células; MOCK 5D: n=53 células; ZIKV 5D: n=59

células). **D:** Amplitude de transiente de Ca^{2+} (MOCK: n=93 células; ZIKV 3D: n=84 células; ZIKV 5D: n=60 células)**. E:** Decaimento de fluorescência (MOCK: n=93 células); ZIKV 3D: n=84 células; ZIKV 5D: n=60 células). **F:** Início retardado da liberação de Ca^{2+} (MOCK: n=91 células; ZIKV 3D: n=83 células; ZIKV 5D: n=58 células. **G:** Imagem representativa de microscópio confocal de MOCK, ZIKV 3D e 5D incubados com indicador Fluo-4 Ca^{2+} e estimulados a 1 Hz. Cada símbolo representa a média ± EPM dos parâmetros obtidos entre os grupos supracitados. *representa diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao resultado observado no grupo MOCK e # em comparação ao ZIKV.

5.5 Reatividade Vascular

A infecção pelo vírus Zika não modificou a contração induzida por cloreto de potássio (KCl), tanto em 3 quanto em 5 dpi, conforme apresentado na Figura 12 (Tabela 4). Isso indica que a contração mediada por um agonista independente de receptor permaneceu inalterada nos grupos avaliados.

Tabela 4: Valores de Emax e pD_2 induzidos por KCl em aortas intactas de animais MOCK e ZIKV, 3 e 5 dpi

Grupos	Emax (mN)	pD_2 (-log EC_{50})	n
MOCK 3D	3,22 ± 0,14	1,58 ± 0,06	12
ZIKV 3D	2,79 ± 0,20	1,55 ± 0,05	08
MOCK 5D	2,60 ± 0,28	1,49 ± 0,06	07
ZIKV 5D	3,13 ± 0,20	1,51 ± 0,03	08

Os valores representam média ± SEM. A significância estatística foi determinada usando one-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Holm-Sidak.

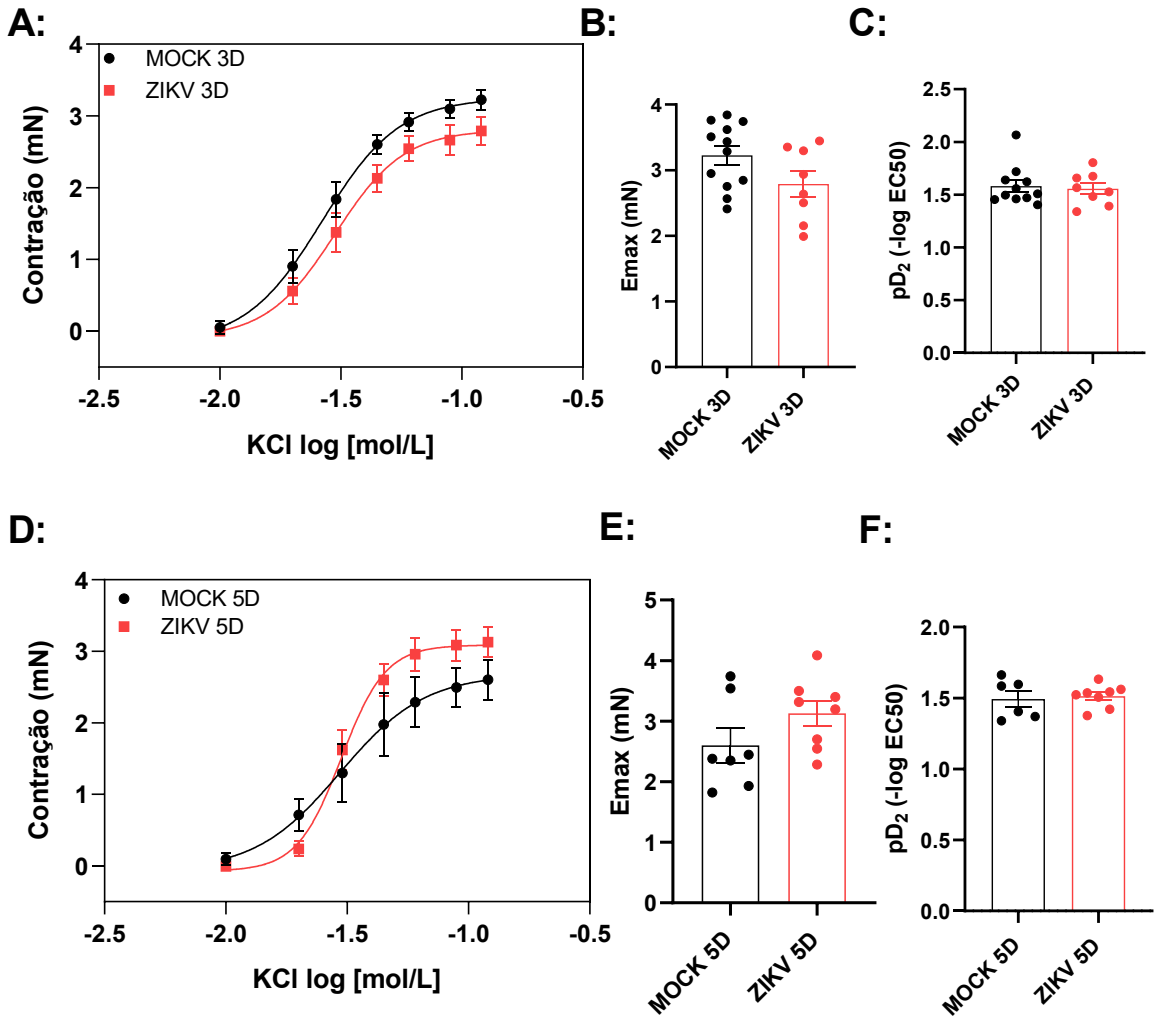


Figura 12: Contração vascular induzida por cloreto de potássio (KCl) em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 3 e 5 dias após a infecção. A e D: Curvas cumulativas concentração-resposta induzida por KCl em aortas de camundongos MOCK e ZIKV 3 e 5 dpi. Valores de Emax e pD_2, obtido para animais MOCK e ZIKV após 3 dpi **(B-C)** e 5 dpi **(D-E)**. Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes.

No 3º dpi a contração induzida por fenilefrina (PE) em aorta de animais infectados por ZIKV não apresentou diferença significativa quando comparado a seu grupo controle (Figura 13 A-C – Tabela 5). Entretanto, no 5º dpi observou-se um prejuízo na contração induzida por fenilefrina nas aortas de animais infectados, ou seja, foi visualizada uma importante hiporresponsividade à fenilefrina (Figura 13 D-F – Tabela 5). Sendo assim, para investigar os mecanismos envolvidos nesta

hiporreatividade aórtica, decidiu-se focar nas respostas de animais infectados por 5 dias.

Tabela 5: Valores de Emax e pD_2 induzidos por PE em aortas intactas de animais MOCK e ZIKV, 3 e 5 dpi

Grupos	Emax (mN)	pD_2 (-log EC_{50})	n
MOCK 3D e+	4,62 ± 0,2	6,84 ± 0,2	10
ZIKV 3D e+	3,90 ± 0,2	7,04 ± 0,2	06
MOCK 5D e+	4,48 ± 0,1	6,89 ± 0,2	12
ZIKV 5D e+	3,53 ± 0,2*	6,64 ± 0,1	09

Os valores representam média ± SEM. A significância estatística foi determinada usando one-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Holm-Sidak. * $p < 0.05$ ZIKV vs. MOCK.

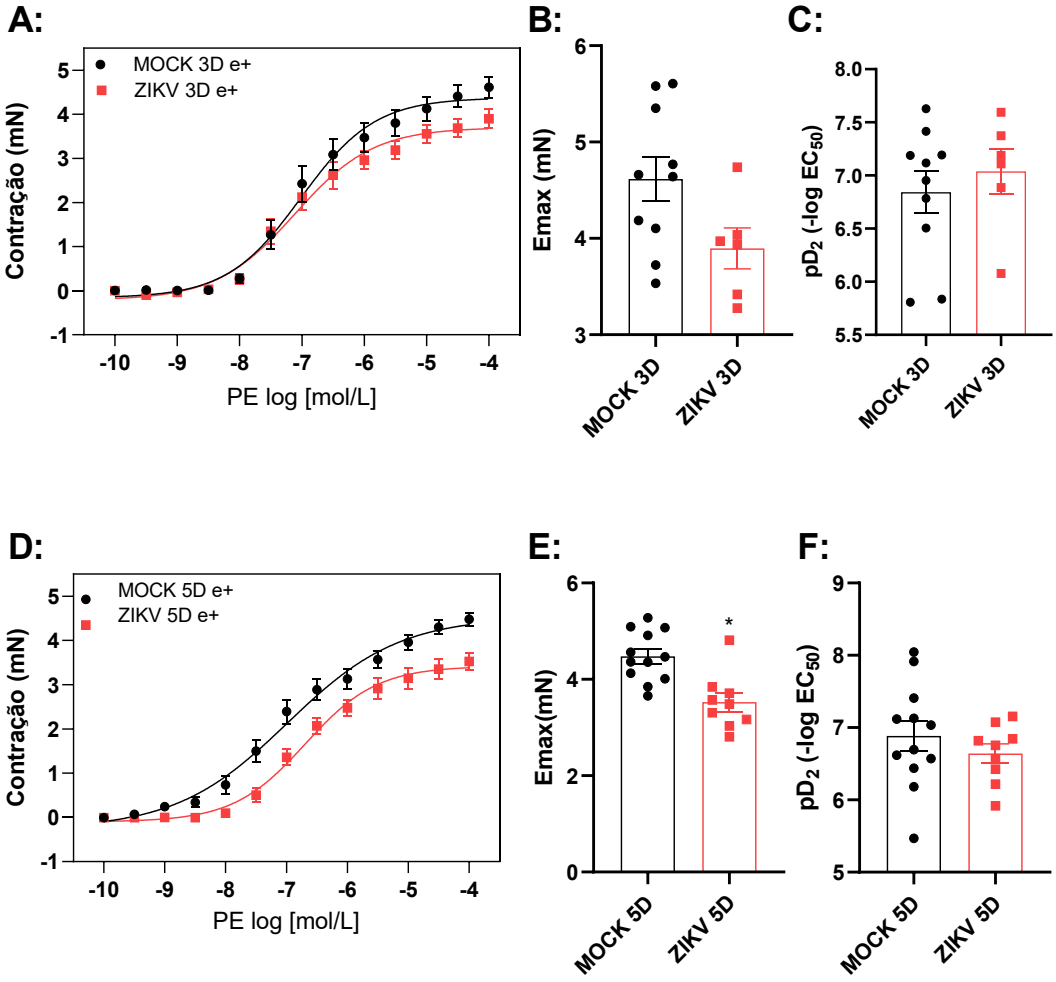


Figura 13: Contração vascular induzida por fenilefrina (PE) em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 3 e 5 dias após a infecção. A e D: Curvas cumulativas concentração-resposta induzida por PE em aortas de camundongos MOCK e ZIKV 3 e 5 dpi. Valores de Emax e pD_2, obtido para animais MOCK e ZIKV após 3dpi **(B-C)** e 5dpi **(D-E)**. Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao grupo MOCK.

Com o objetivo de avaliar o papel do endotélio na resposta vascular de anéis aórticos de animais infectados pelo ZIKV, o endotélio foi removido mecanicamente. No 3º dia pós-infecção (dpi), não foram observadas diferenças entre os anéis aórticos de animais infectados e os do MOCK. E o perfil de resposta, neste tempo, entre vasos intactos (com endotélio) e aqueles sem endotélio, foi similar. No entanto, no 5º dpi, a hiporreatividade previamente observada nos anéis infectados mostrou-se dependente da participação endotelial. Isso porque, após a remoção do endotélio, a contração dos anéis de animais infectados foi significativamente maior que a dos anéis do grupo

controle (MOCK), revertendo a hiporreatividade vista na presença do endotélio (FIGURA 14 - tabela 6).

Tabela 6: Valores de Emax e pD_2 induzidos por PE em aortas sem endotélio de animais MOCK e ZIKV, 3 e 5 dpi

Grupos	Emax (mN)	pD_2 (-log EC_{50})	n
MOCK 3D e-	4,91 ± 0,25	7,25 ± 0,23	8
ZIKV 3D e-	4,11 ± 0,31	7,50 ± 0,12	7
MOCK 5D e-	4,41 ± 0,16	7,34 ± 0,22	11
ZIKV 5D e-	5,17 ± 0,17*	7,42 ± 0,14	14

e-: ausência de endotélio. Os valores representam média ± SEM. A significância estatística foi determinada usando one-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Holm-Sidak. * $p < 0.05$ ZIKV vs. MOCK.

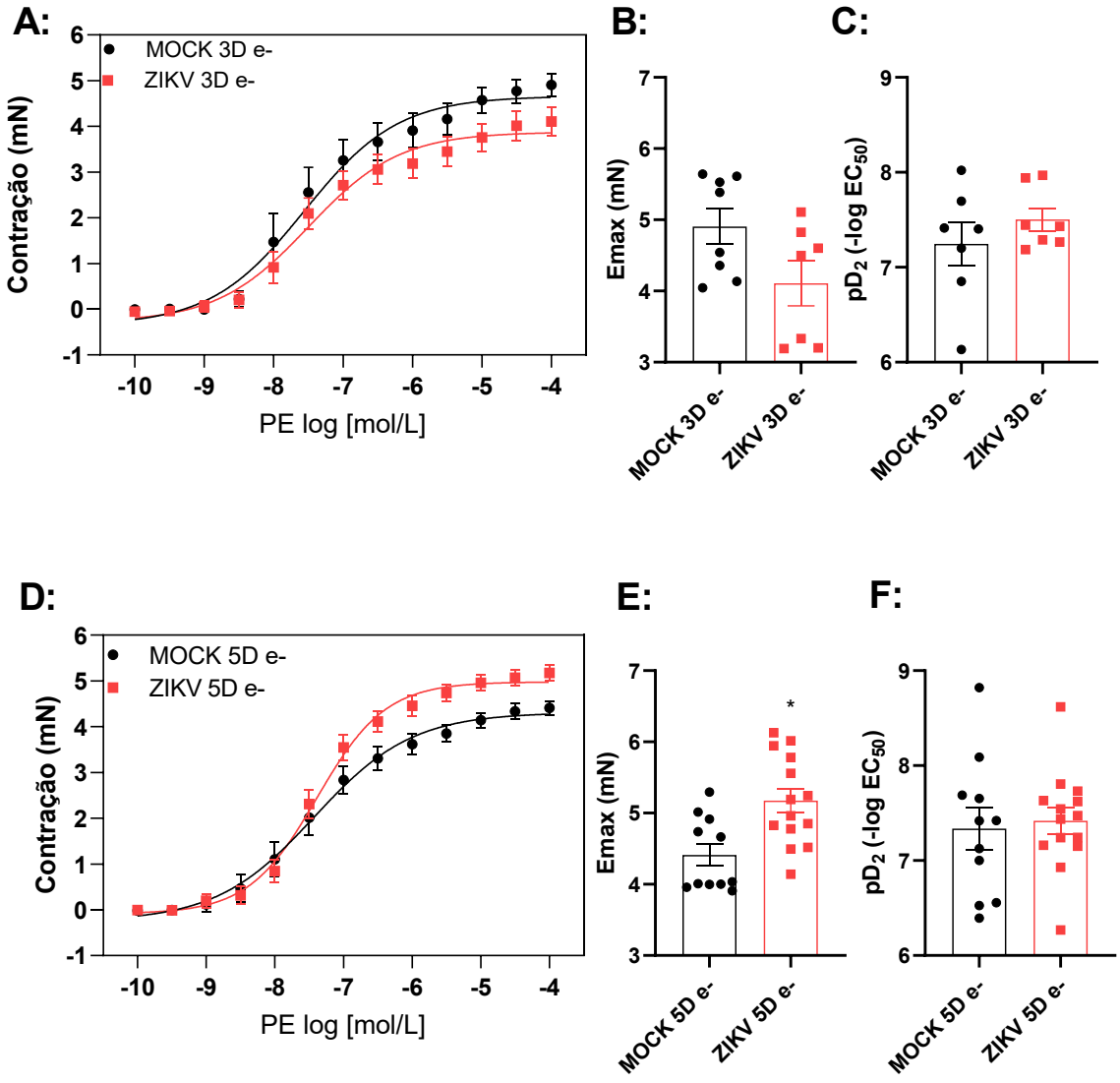


Figura 14: Contração vascular induzida por fenilefrina (PE) em anéis de aortas na ausência de endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 3 e 5 dias após a infecção. A e D: Curvas cumulativas concentração-resposta induzida por PE em aortas de camundongos MOCK e ZIKV 3 e 5 dpi. Valores de Emax e pD_2, obtido para animais MOCK e ZIKV após 3dpi **(B-C)** e 5dpi **(D-E)**. Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao grupo MOCK.

5.5.1 Participação do receptor CCR5 na hiporreatividade vascular à PE em aortas de animais infectados por ZIKV 5dpi

Trabalhos na literatura demonstraram envolvimento de CCR5 em infecções por ZIKV. Com o objetivo de investigar se a quimiocina CCL5, ao interagir com o receptor

CCR5, participa da hiporreatividade à fenilefrina, incubou-se os anéis aórticos com o antagonista seletivo desse receptor, Maraviroc. Observou-se uma reversão da hiporreatividade, indicando que a infecção aguda com ZIKV provoca esse prejuízo contrátil por meio da ativação desse receptor (Figura 15 A-C – Tabela 7).

Tabela 7: Valores de Emax e pD_2 induzidos por PE em aortas intactas de animais MOCK e ZIKV 5 dpi, antes e após incubação com Maraviroc ($4x10^{-5}$ mol/L).

Grupos	Emax (mN)	pD_2 (-log EC_{50})	n
MOCK 5D	5,98 ± 0,5	7,11 ± 0,2	07
ZIKV 5D	4,45 ± 0,2*	6,94 ± 0,2	08
MOCK + MARAVIROC	5,68 ± 0,3	6,83 ± 0,4	06
ZIKV + MARAVIROC	5,72 ± 0,2#	6,76 ± 0,2	06

Os valores representam média ± SEM. A significância estatística foi determinada usando two-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Holm-Sidak. *p < 0.05 ZIKV vs. MOCK. #p < 0.05; ZIKV+Maraviroc vs ZIKV.

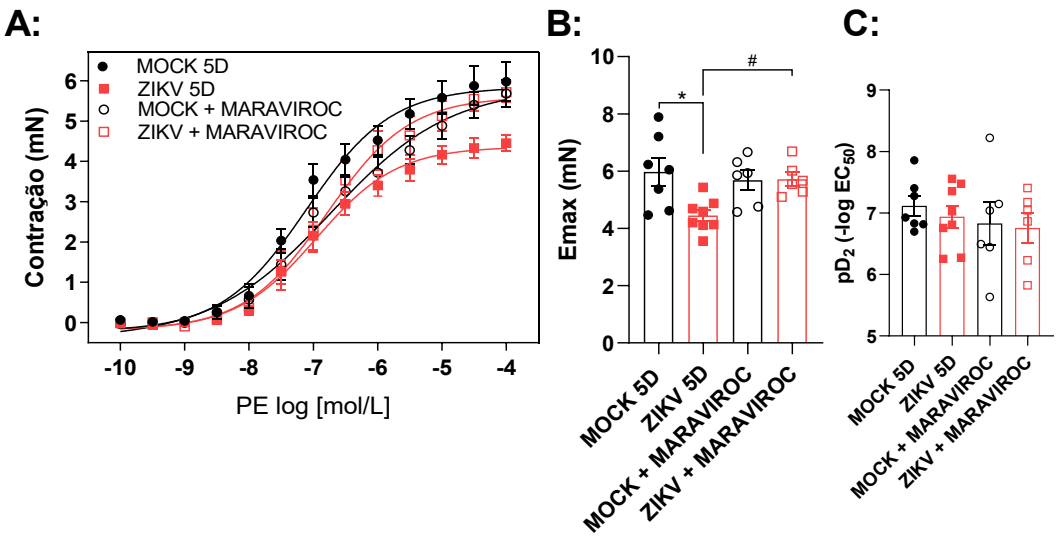


Figura 15: Envolvimento do receptor do CCR5 na hiporresponsividade vascular à PE em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 5dpi. A: Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE em aortas de camundongos na presença e na ausência de Maraviroc ($4x10^{-5}$ mol/L) (antagonista receptor CCR5). **B-C:** Representação gráfica dos valores de Emax e pD_2, respectivamente induzidos por PE. *representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo MOCK e # em relação ao ZIKV.

5.5.2 Participação da enzima ciclooxigenase (Isoforma 1 e 2) e da ativação do receptor de prostaciclina na hiporreatividade vascular à PE em aortas de animais infectados por ZIKV 5dpi

Avaliou-se a participação das isoformas 1 e 2 da enzima ciclooxigenase (COX) realizando a incubação com Mofezolac (inibidor seletivo COX-1) (Figura 16 A-C – Tabela 8) e Celecoxibe (inibidor seletivo COX-2) (Figura 16 D-F – Tabela 8). A incubação com ambos inibidores levou a reversão da hiporreatividade à PE, indicando a participação de ambas isoformas da COX.

Visto que em animais infectados por ZIKV há prejuízo no relaxamento vascular à PE e que a atividade das COXs reverte este prejuízo, investigou-se se o produto da COX envolvido neste processo seria a prostaciclina. Os resultados mostraram reversão completa da hiporreativdade detectada anteriormente (Figura 16 G-I – Tabela 8).

Tabela 8: Valores de Emax e pD_2 induzidos por PE em aortas intactas de animais MOCK e ZIKV 5 dpi, antes e após incubação com Mofezolac (10^{-6} mol/L), Celecoxib (10^{-6} mol/L) ou RO1138452 (10^{-6} mol/L)

Grupos	Emax (mN)	pD_2 (-log EC_{50})	n
MOCK 5D	4,48 ± 0,1	6,89 ± 0,2	12
ZIKV 5D	3,53 ± 0,2*	6,64 ± 0,1	09
MOCK + MOFEZOLAC	4,86 ± 0,3$^{\$}$	7,26 ± 0,2	05
ZIKV + MOFEZOLAC	4,63 ± 0,2$^{\#}$	7,43 ± 0,2$^{\#}$	06
MOCK + CELECOXIBE	4,87 ± 0,4	7,11 ± 0,3	06
ZIKV + CELECOXIBE	4,42 ± 0,3$^{\#}$	6,57 ± 0,2	04
MOCK + RO1138452	4,40 ± 0,3	7,06 ± 0,1	12
ZIKV + RO1138452	4,48 ± 0,3$^{\#}$	6,99 ± 0,2	10

Os valores representam média ± SEM. A significância estatística foi determinada usando two-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Holm-Sidak. $^{*}p < 0.05$ ZIKV vs. MOCK. $^{\#}p < 0.05$; ZIKV+Incubação vs ZIKV. $^{\$}p < 0.05$ MOCK vs. MOCK+ Incubação.

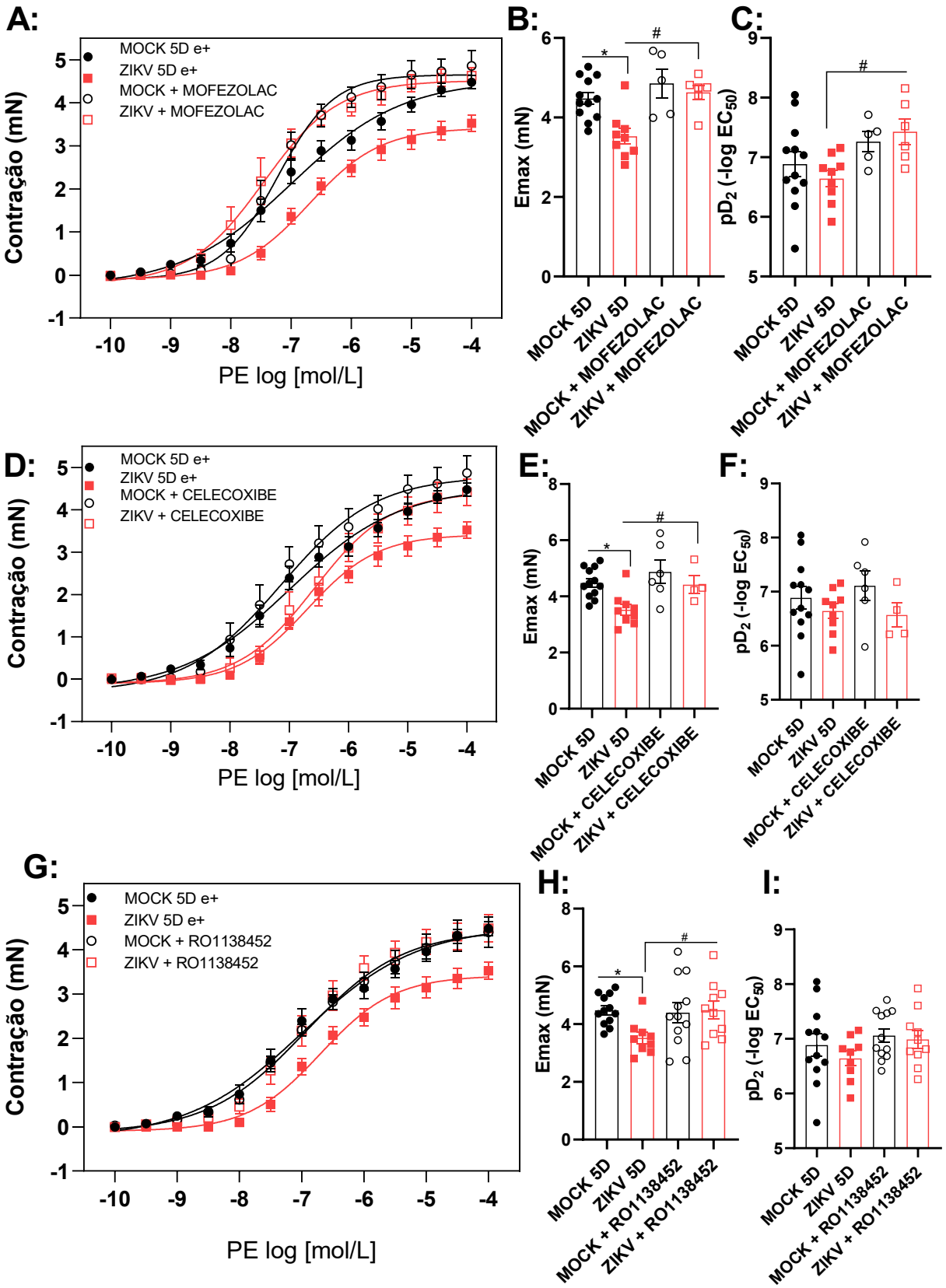


Figura 16: Análise do envolvimento da enzima ciclooxigenase (COX) e de prostaciclina, na hiporresponsividade vascular à PE em anéis de aortas com endotélio dos grupos

experimentais MOCK e ZIKV 5dpi. Curvas cumulativas concentração-resposta induzidas por PE em aortas de camundongos na presença e na ausência de Mofezolac (10^{-6} mol/L) **(A)**, Celecoxibe (10^{-6} mol/L) **(D)** e **(G)**. Representação gráfica dos valores de Emax pD_2 induzidos por PE após incubação com Mofezolac (**B-C**), Celecoxibe (**E-F**) e RO1138452 (10^{-6} mol/L) (**H-I**). Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo MOCK e # em relação ao ZIKV.

5.5.3 Participação da proteína quinase A (PKA) na hiporreatividade vascular

Uma vez que foi identificado a ativação de receptores de prostaciclina na hiporreatividade vascular à PE e sabendo que a PKA é a quinase envolvida devido a ativação do receptor IP para prostaciclina, investigou-se a participação da PKA utilizando-se seu inibidor seletivo (KT-5720) (10^{-6} mol/L). Anéis aórticos incubados com KT-5720 apresentaram reversão da hiporreatividade causa pela infecção por ZIKV (Figura 17 A-C – Tabela 9).

Tabela 9: Valores de Emax e pD_2 induzidos por PE em aortas intactas de animais MOCK e ZIKV 5 dpi, antes e após incubação com KT5720 (10^{-6} mol/L)

Grupos	Emax (mN)	pD_2 (-log EC_{50})	n
MOCK 5D	5,98 ± 0,5	7,11 ± 0,2	07
ZIKV 5D	4,45 ± 0,2*	6,94 ± 0,2	08
MOCK + KT-5720	5,79 ± 0,6	7,06 ± 0,5	05
ZIKV + KT-5720	5,49 ± 0,4#	7,10 ± 0,2	06

Os valores representam média ± SEM. A significância estatística foi determinada usando one-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Holm-Sidak. *p < 0.05 ZIKV vs. MOCK. #p < 0.05; ZIKV+KT-5720 vs ZIKV.

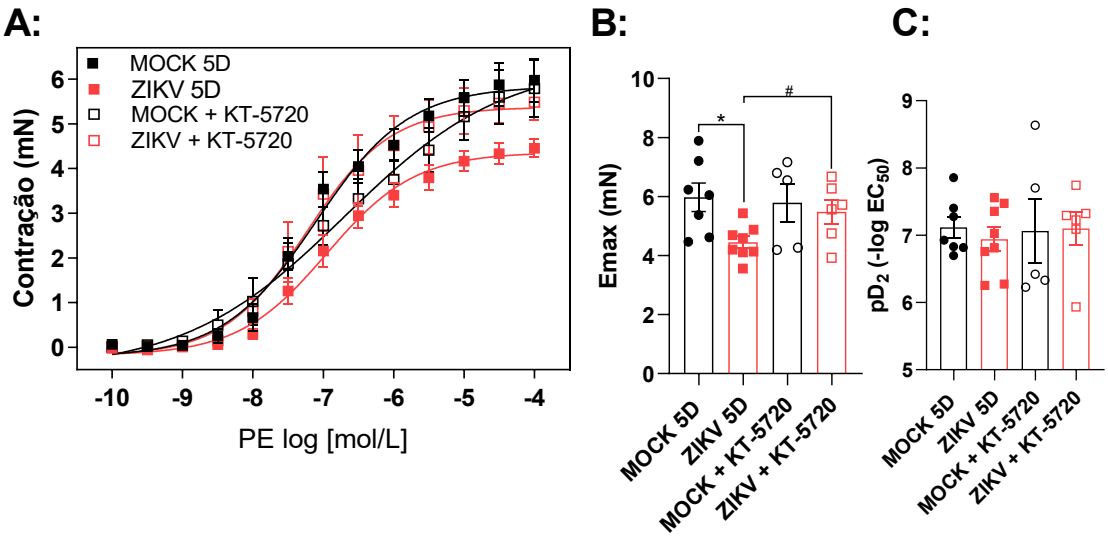


Figura 17: Análise do envolvimento da proteína quinase A (PKA) na hiporresponsividade vascular à PE em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 5dpi. A: Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE em aortas de camundongos na presença e na ausência de KT-5720 (inibidor da enzima PKA) (10^{-6} mol/L). **B-C:** Representação gráfica dos valores de Emax e pD_2 da contração induzida por PE. Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao grupo MOCK e # em relação ao ZIKV.

5.5.4 Participação de óxido nítrico na hiporreatividade vascular

Um outro importante agente vasodilatador que poderia estar envolvido na resposta de hiporreatividade vascular à PE em animais infectados com ZIKV é o óxido nítrico (NO). Os resultados mostraram que a incubação com L-NAME (10^{-4} mol/L) (inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS) promoveu um aumento da contração máxima (Emax) em ambos os grupos (MOCK e ZIKV), indicando a participação basal do NO no tônus vascular. No entanto, a diferença significativa de contração entre os grupos ZIKV e MOCK observada antes da incubação se manteve após a inibição da NOS com L-NAME (Figura 18 A-C – Tabela 10). Portanto a ativação da NOS não participa do prejuízo da resposta contrátil à PE em aortas de animais infectados por ZIKV.

Tabela 10: Valores de Emax e pD_2 induzidos por PE em aortas intactas de animais MOCK e ZIKV 5 dpi, antes e após incubação com L-NAME (10-4 mol/L).

Grupos	Emax (mN)	pD_2 (-log EC_{50})	n
MOCK 5D	4,48 ± 0,1	6,89 ± 0,2	12
ZIKV 5D	3,53 ± 0,2*	6,64 ± 0,1	09
MOCK + L-NAME	6,97 ± 0,4$	7,74 ± 0,2&	07
ZIKV + L-NAME	5,56 ± 0,3#	7,82 ± 0,5#	12

Os valores representam média ± SEM. A significância estatística foi determinada usando two-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Holm-Sidak. *p < 0.05 ZIKV vs. MOCK. #p < 0.05; ZIKV+L-NAME vs ZIKV. $p < 0.05 MOCK vs. MOCK+ L-NAME.

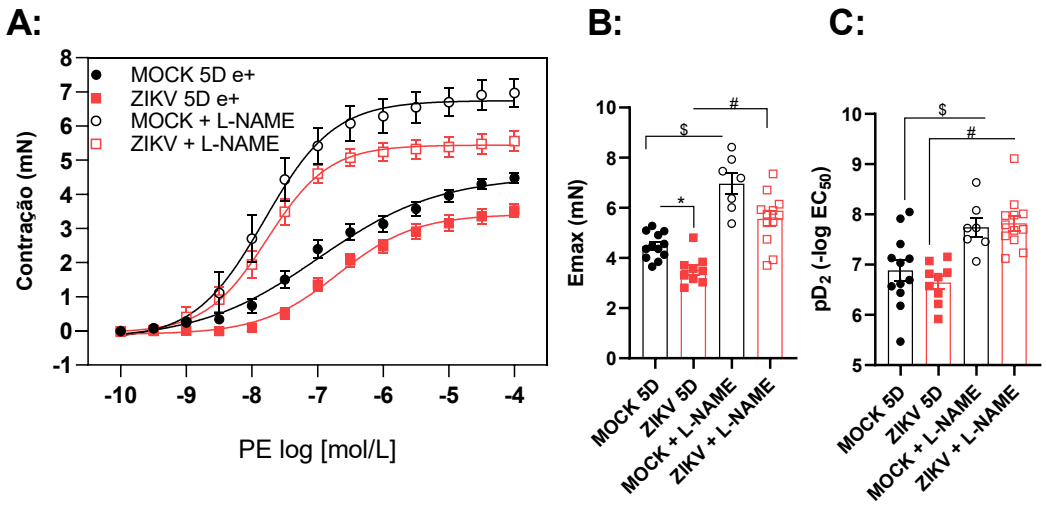


Figura 18: Análise do envolvimento da enzima óxido nítrico sintase (NOS), na hiporresponsividade vascular à PE em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais MOCK e ZIKV 5dpi. A: Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE em aortas de camundongos na presença e na ausência de L-NAME (10^{-4} mol/L) (inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase). **B-C:** Representação gráfica dos valores de Emax e pD_2 da contração induzida por PE. Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo MOCK, # em relação ao grupo ZIKV e $ comparando MOCK x MOCK incubado.

5.6 Impacto da infecção aguda por ZIKV no dimorfismo sexual

5.6.1 Papel dos hormônios femininos na infecção por ZIKV

Massa corporal

A infecção por ZIKV causou uma perda de massa corporal de aproximadamente 10% nas fêmeas, em 3 dpi, assim como nos machos. Entretanto, as fêmeas recuperaram o peso no 5º dpi, diferente dos machos que perderam aproximadamente 20% do peso no 5º dpi [valor expresso em % - MOCK 3D: 101,14 ± 1,31 (n=04); MOCK 5D: 99,45 ± 0,43 (n=04); ZIKV 3D: 90,85 ± 2,03 (n=04) e ZIKV 5D: 94,65 ± 2,46 (n=06)] (Figura 19 A).

Pressão arterial sistólica

Foi observada diferença na pressão arterial sistólica de machos e fêmeas antes da infecção com ZIKV, confirmando o dimorfismo sexual. Valor expresso em mmHg – MOCK macho 3D: 107 ± 3 (n=17); MOCK fêmea 3D: 101 ± 4 (n=06); MOCK macho 5D: 103 ± 1 (n=19) e MOCK fêmea 5D: 101 ± 0.2 (n=06). Entretanto, após a infecção as fêmeas não apresentaram hipotensão arterial que foi visualizada nos machos no 3 dpi [Valor expresso em mmHg - ZIKV macho 3D: 86 ± 3 (n=16); ZIKV fêmea 3D: 93 ± 2 (n=08); ZIKV macho 5D: 96 ± 2 (n=21) e ZIKV fêmea 5D: 98 ± 2 (n=05)] (Figura 19 B).

Reatividade Vascular

Os resultados referentes à reatividade aórtica à PE, em fêmeas, mostraram que a infecção não altera a resposta contrátil a este agonista, uma vez que não houve diferença estatística na contração induzida por este agente entre animais infectados e controles em 3 e 5 dpi (Figura 19 C-F – Tabela 11). Sugerindo uma possível proteção hormonal contra a infecção por ZIKV, não visualizada nos machos.

Tabela 11: Valores de Emax e pD2 induzidos pela PE em aortas intactas e camundongos machos e fêmeas da linhagem A129 infectados ou não com ZIKV.

Grupos	Emax (mN)	pD_2 (-log EC_{50})	n
MOCK macho 3D	4,62 ± 0,2	6,84 ± 0,2	10
ZIKV macho 3D	3,90 ± 0,2	7,04 ± 0,2	06
MOCK fêmea 3D	4,75 ± 0,16	7,54 ± 0,19	03
ZIKV fêmea 3D	5,07 ± 0,43	6,84 ± 0,31	05
MOCK macho 5D	4,48 ± 0,1	6,89 ± 0,2	12
ZIKV macho 5D	3,53 ± 0,2*	6,64 ± 0,1	09
MOCK fêmea 5D	5,68 ± 0,45	7,10 ± 0,24	03
ZIKV fêmea 5D	4,99 ± 0,28	7,50 ± 0,06	03

Os valores representam média ± SEM. A significância estatística foi determinada usando one-way e two-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Holm-Sidak. *$p < 0.05$ ZIKV vs. MOCK.

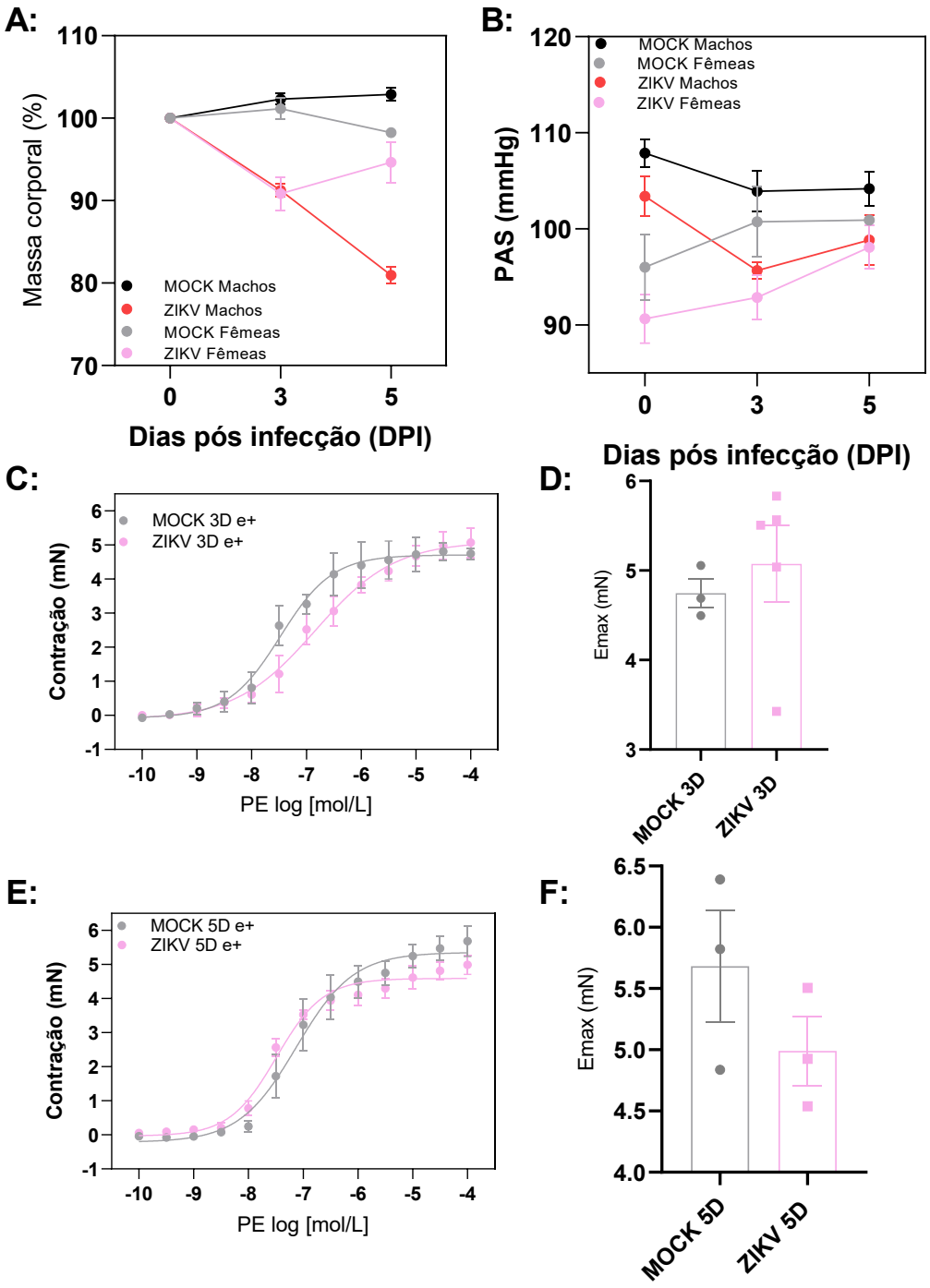


Figura 19: Avaliação da massa corporal, pressão arterial sistólica e reatividade à PE em fêmeas da linhagem A129. A: Massa corporal. Avaliação temporal da massa corporal entre os grupos MOCK e ZIKV (n=4-14) **B**: Pressão arterial sistólica (PAS) (n=6-10). Curvas cumulativas concentração-resposta à PE em aortas com endotélio de camundongos infectados com ZIKV 3 dias (**C**) e 5dpi (**E**). Representação gráfica dos valores de Emax da contração induzida por PE em camundongos infectados com ZIKV 3 dpi (**D**) e 5dpi (**F**). Cada círculo/barra representa a média ± EPM da massa corporal obtida para MOCK e ZIKV. *

representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo MOCK e # em relação ao grupo ZIKV.

5.7 Impacto da infecção congênita por ZIKV na reatividade vascular

Como mostrado nos resultados anteriores, a infecção aguda por ZIKV causou um importante prejuízo da resposta à fenilefrina. Entretanto, a infecção congênita causou na prole uma resposta oposta. Foi observado um aumento da contração à fenilefrina em camundongos machos adultos, cujas mães foram infectadas por ZIKV durante a gestação. As fêmeas não apresentaram alteração, sugerindo, novamente, uma possível proteção hormonal (Figura 20 A-D – Tabela 12).

Tabela 12: **Valores de Emax e pD_2 induzidos pela PE em aortas intactas e camundongos machos e fêmeas cujas mães foram infectadas ou não, durante a gravidez, com ZIKV.**

Grupos	Emax (mN)	pD_2 (-log EC_{50})	n
Controle Macho	2,14 ± 0,08	7,09 ± 0,20	05
ZIKV Congênita Macho	2,70 ± 0,22*	7,54 ± 0,30	05
Controle Fêmea	1,87 ± 0,12	7,28 ± 0,18	06
ZIKV Congênita Fêmea	2,17 ± 0,26	7,15 ± 0,10	04

Os valores representam média ± SEM. A significância estatística foi determinada usando one-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Holm-Sidak. * $p < 0.05$ Controle vs. ZIKV congênita

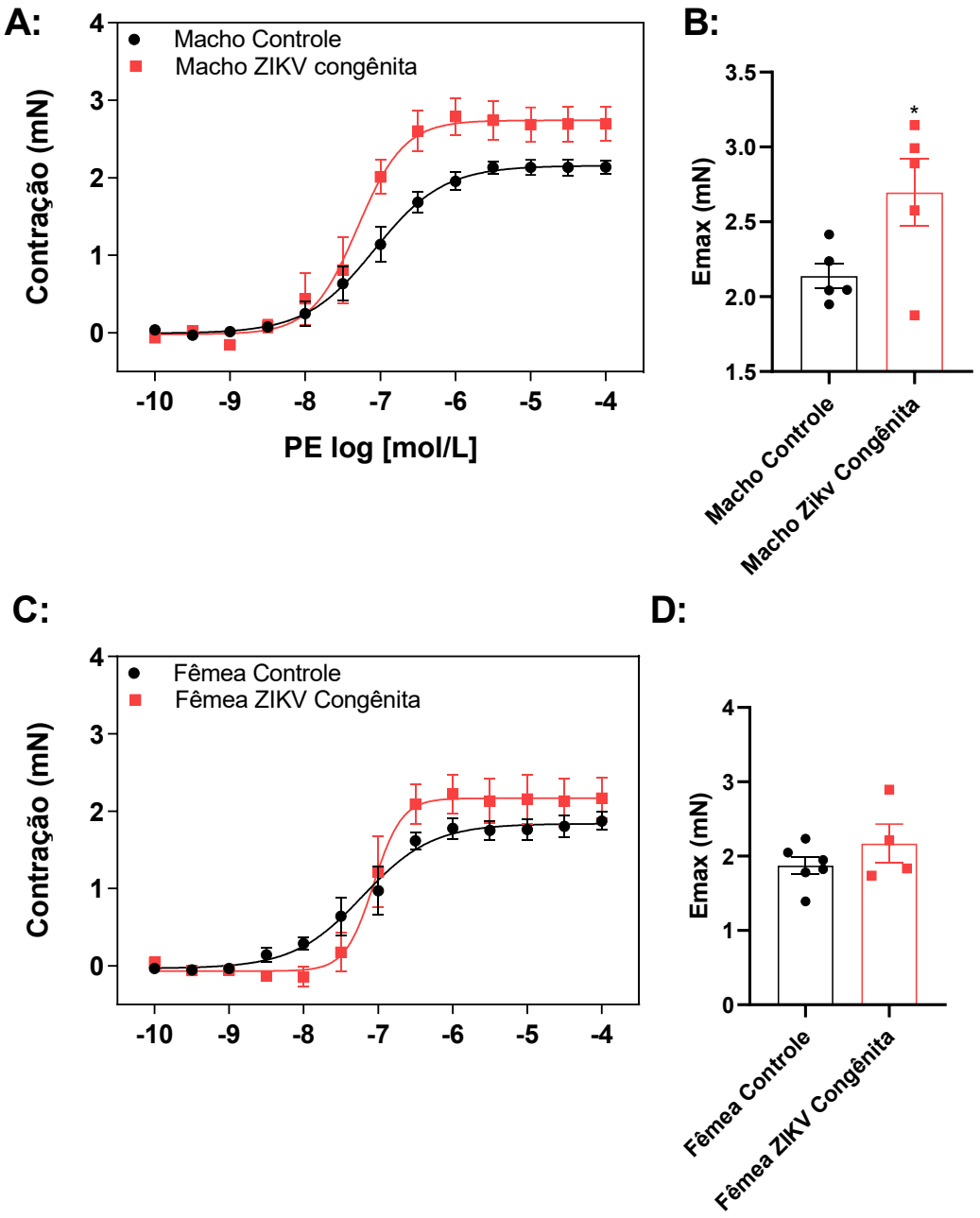


Figura 20: Contração vascular induzida por Fenilefrina (PE) em anéis aórticos intactos dos grupos MOCK e ZIKV após infecção congênita. Curvas cumulativas concentração-resposta induzida por PE realizadas em aortas de camundongos machos (**A**) e fêmea (**C**) após a infecção congênita por ZIKV. Representação gráfica dos valores de Emax obtidos para PE em aortas de camundongos machos (**B**) e fêmea (**D**) após a infecção congênita por ZIKV. Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao grupo MOCK.

6. Discussão

A associação da infecção por ZIKV com microcefalia e distúrbios neurológicos graves, vem causando preocupações globais (GULLAND, 2016; LI et al., 2016), podendo ocasionar também restrição de crescimento intrauterino e morte fetal (LI et al., 2016). Além de tais complicações, a infecção por ZIKV também pode acometer o sistema cardiovascular (KRITTANAWONG; ZHANG; SUN et al., 2016), gerando arritmia e possível insuficiência cardíaca (HUSSAIN et al., 2018). Entretanto, pouco ainda se sabe, de fato, sobre os impactos no sistema cardiovascular de indivíduos infectados pelo ZIKV. A escassez de estudos que investigam a relação entre o ZIKV e o sistema cardiovascular exige que sejam considerados trabalhos com outros arbovírus, como o vírus da dengue (DENV) e o chikungunya (CHIKV), cuja interação com o sistema cardiovascular já foi mais explorada na literatura.

O primeiro passo do presente trabalho foi caracterizar a infecção aguda pelo ZIKV através da avaliação de parâmetros clínicos, como score clínico e massa corporal. O score clínico de animais infectados por ZIKV estava consideravelmente aumentado quando comparado ao controle, indicando o impacto da infecção no indivíduo, como por exemplo dor, mal-estar e indisposição. Foi avaliado a postura, o aspecto do pelo, a atividade do animal e se houve perda de massa corporal. Os parâmetros avaliados possibilitam a predição da morbidade visualizada nos animais infectados. Vellere et al. (2020), relataram a importância de um score clínico para a distinção entre as arboviroses mais frequentes: Dengue, Chikungunya e Zika em humanos, principalmente por essas doenças apresentarem quadro clínico e dados epidemiológicos semelhantes (VELLERE et al., 2020). No presente trabalho, o uso de score clínico não teve como objetivo distinguir as arboviroses, como foi o caso do trabalho de Vellere et al. (2020), Lee et al. (2012), Braga et al. (2017), mas sim verificar a morbidade causada pela infecção pelo Zika vírus e validar o modelo. Li et al. (2022), recentemente pesquisaram a infecção por ZIKV de duas linhagens diferentes (africana e asiática), infectando a mesma linhagem animal do presente estudo (camundongos A129, deficientes para o receptor de Interferon I). Eles realizaram um score clínico analisando os seguintes parâmetros: letargia e inatividade; fraqueza e pelo eriçado; sintomas neurológicos, como paralisia e tremores; e óbito. E assim como no presente estudo, os animais infectados apresentaram um alto score clínico, bem como visto por Branche et al. (2019). Lin et al. (2023) também avaliaram, em seu score clínico, leve

perda de peso, motilidade lenta, astenia e anorexia, letargia e morte. Os animais infectados ZIKV apresentaram um alto score clínico já no 2º dia pós infecção (dpi) e se manteve elevado até o último dia avaliado (6º dpi).

Além da avaliação da morbidade nos animais infectados, a avaliação da massa corporal também foi inserida como um dos parâmetros avaliados no score clínico do presente trabalho para confirmação da infecção, uma vez que os animais infectados 3 dpi, já apresentaram perda de massa quando comparado ao grupo controle (MOCK). No 5º dpi, a massa do animal infectado estava ainda mais reduzida, cerca de 20% de perda de massa corporal, não visualizado no grupo MOCK. A hipótese é que provavelmente a infecção não só cause dor e mal-estar no animal impossibilitando-o de ir em busca de sua ração e água, mas a infecção, *per se*, também pode levar a uma perda de massa magra. No trabalho supracitado (LI et al., 2022), também visualizaram perda importante de massa corporal no 5º dpi, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho e se diferenciando da avaliação da massa corporal no 3º dpi, que não foi verificado no trabalho de Li et al. (2022). Em caso de uma infecção por dengue, que assim como o ZIKV é um arbovírus, Chuong et al. (2020) também observaram perda de massa corporal em animais infectados. Rossi et al., (2016), também observaram perda de massa corporal no 5º dpi em animais A129 infectados com ZIKV, bem como Branche et al. (2019). Lin et al. (2023), visualizaram uma perda de massa corporal ainda maior que a visualizada no presente estudo, 28%, mas com um inóculo viral superior.

Diante da redução da massa corporal observada em animais infectados, investigou-se se essa diminuição estaria relacionada à perda de massa magra, indicando um possível quadro de sarcopenia. Para isso, foi realizada a mensuração da massa do músculo tibial anterior, corrigida pelo comprimento da tíbia. Apesar da perda de massa corporal, não foi observada alteração na massa muscular, diferente do que foi observado por Gavino-Leopoldino et al. (2021), que estudaram a infecção congênita causada por ZIKV e observaram que a replicação viral nas células musculares leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias desencadeando uma disfunção muscular por causar lesões necróticas e atrofia, comprometendo a miogênese (GAVINO-LEOPOLDINO et al., 2021). Em outras arboviroses, como por Chikungunya e Mayaro, também foi verificado que a infecção induz atrofia muscular esquelética crônica devido à presença viral gerando um processo inflamatório e

oxidativo (SILVA et al., 2024). A ausência de alteração na massa muscular do presente trabalho pode ser justificada por uma desidratação e também perda de adipócitos. Provavelmente, pelo tempo de infecção ser bem agudo (3 e 5 dpi) não foi visualizada perda de massa magra. Como a infecção aguda por ZIKV não gerou sarcopenia, a mensuração do índice de adiposidade foi realizada e mostrou alteração significativa entre os grupos.

Além do desconforto físico que a doença trás, como dor, febre, a infecção por zika, *per se,* pode causar alteração na adiposidade através da mobilização de reservas energéticas pelo aumento da demanda metabólica por ativação de resposta inflamatória. O trabalho desenvolvido por Qin e colaboradores (2022), mostrou que a infecção celular por zika induziu a lipofagia ativando a quinase 1 semelhante à unc-51 (ULK1) por meio da ativação da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMP) 5' (AMPK). Esse grupo de pesquisa demonstrou que a atividade de AMPK em Thr-172 e ULK1 em Ser-556 estavam aumentadas em células infectadas pelo ZIKV e intimamente correlacionadas com a indução da lipofagia (QIN, Z. et al., 2022). Infecções também podem elevar citocinas inflamatórias que desencadeiam lipólise, como observou Du et al. (2022) no estudo de adipócitos bovinos em que o fator de necrose tumoral (TNF) prejudica a sensibilidade à insulina e induz lipólise e apoptose em adipócitos bovinos, que podem ser parcialmente mediadas pela ativação de NF-κB e JNK (DU et al., 2022).

Não foi observado na literatura, que em uma arbovirose, a redução da massa corporal seja em função da desidratação. Mas a infecção pode levar à perda de líquidos e eletrólitos, afetando a massa corporal. De acordo com Victora et al. (1997), o baixo peso corporal pode ser um indicador simples para prever a desidratação. No presente trabalho, a infecção por ZIKV causou morbidade, com deterioração do estado clínico dos animais infectados, os quais apresentaram perda de apetite nos dois tempos de estudo e redução do consumo de água somente no 5 dpi. De acordo com Hart (1988), a inflamação aguda gera anorexia e também impacta no consumo de água. Em parte, essa falta de motivação por procura de comida é agradável ao animal para que ele não saia do ninho ou abrigo, evite a dissipação do calor corporal, principalmente porque a infecção pode causar febre (Hart, 1988). Pacientes hospitalizados, infectados por SARS-CoV-2 (COVID-19) apresentaram risco de

desnutrição associados aos sintomas da infecção (ZANNIDI et al., 2022; SIKAROUDI et al., 2021).

Essa baixa procura por comida causada em função dos sintomas clínicos da infecção, bem como a infecção *per se*, provavelmente, alteraram o índice glicêmico dos animais infectados por ZIKV no presente trabalho. Nos estudos realizados por Rattarasarn (1997), em pacientes sépticos, foi mensurado a glicose plasmática que se encontrava reduzida. E nesse estudo, a hipoglicemia em pacientes com sepse foi associada a um prognóstico grave da doença. Jan et al. (2009), analisando adultos e crianças com infecção pneumocócica observou a ocorrência de hipoglicemia em 8,6% desses pacientes e foi relacionada à alta mortalidade e sorotipos que geravam a doença invasiva grave. No estudo desenvolvido por Jan et al. (2009), uma criança e todos os adultos morreram (JAN et al., 2009).

Além dos parâmetros clínicos, o hemograma foi realizado para verificação dos parâmetros hematológicos e inflamatórios/imunológicos. Também com o objetivo de caracterizar o modelo de ZIKV aguda. Em 5 dpi, observou-se aumento no número de leucócitos total, principalmente pelo aumento de granulócitos e monócitos. O número de linfócitos se manteve inalterado, entretanto, Andrade et al. (2021) observaram linfopenia em mulheres grávidas infectadas com ZIKV, porém é mais comum em infecção por dengue (KOTEPUI et al. 2017). Na parte hematológica, no presente trabalho, foi visualizado redução no volume corpuscular médio dos eritrócitos sugerindo anemia (GUO et al., 2020). Entretanto, foi identificado um sutil aumento nos níveis de hemoglobina. Não houve alteração nas plaquetas, como esperado em uma infecção por ZIKV. Andrade et al. (2021), realizaram um estudo comparando mulheres grávidas infectadas ou não por ZIKV e detectaram leucopenia e neutropenia. Já Nguyen et al. (2017), identificaram neutrofilia, como visualizado no presente trabalho, em macacos rhesus fêmeas prenhes infectadas por ZIKV. Com relação aos níveis plaquetários, que na infecção por dengue encontra-se reduzido (LIEN et al., 2021; ADANE; GETAWA, 2021; COLOMBO et al., 2017), estava inalterado em mulheres grávidas ZIKV-infectadas independente do estágio de infecção (ANDRADE et al., 2021), como visto no presente trabalho em machos. O aumento de leucócitos (monócitos e granulócitos) após 5 dpi sugere uma ativação do sistema imune inato (estado inflamatório agudo). A ausência de alteração nos linfócitos sugere que a resposta adaptativa ainda não está plenamente ativada.

Após a caracterização clínica e hematológica do modelo, investigamos a presença viral nos tecidos-alvo — coração, aorta e plasma — para compreender a dinâmica da infecção pelo ZIKV. Nossos resultados demonstraram a presença do vírus tanto no coração quanto na aorta, confirmando que esses tecidos foram diretamente infectados. No plasma, a titulação viral no 5º dia pós-infecção (dpi) mostrou redução nas unidades formadoras de placa (PFU), sugerindo que parte dos vírus já haviam se deslocado da circulação e se alojado nos tecidos-alvo.

Já é conhecido que o ZIKV é um vírus neurotrópico e está presente no cérebro após 3 e 6 dpi (COSTA et al. 2017). Andrade et al. (2021), também identificaram a presença do RNA viral no cérebro de fetos A129 em que a mãe foi infectada. Branche et al. (2019) também detectaram RNA viral no cérebro. A presença do vírus no coração é um importante indicativo de lesão tecidual que pode impactar na função desse órgão. Weinbren e Williams (1958), descobriram que além de lesão em áreas cerebrais, como hipocampo, os animais infectados por ZIKV com 1 a 5 dias de vida apresentavam também lesões no músculo esquelético e no miocárdio, apresentando miocardite. Os resultados referentes ao ZIKV no sistema cardiovascular ainda são escassos e o presente estudo traz essa tão necessária abordagem. Li e colaboradores (2022), identificaram o RNA do ZIKV em vários tecidos, incluindo o coração e plasma após 8 dpi. Rossi et al. (2016), também identificaram presença viral no coração de animais machos (A129) infectados no 6 dpi. A PFU foi muito semelhante à encontrada no presente trabalho. Nenhum trabalho foi encontrado na literatura mostrando a presença do ZIKV em aortas de animais infectados. Foi encontrado somente um trabalho que utilizou células primárias de aorta para verificar se elas suportavam uma infecção por ZIKV. Esse trabalho desenvolvido por Zhang et al. (2019) mostrou que as células primárias de aorta eram permissivas à infecção pelo ZIKV e poderiam favorecer a replicação viral (ZHANG et al., 2019). Portanto, o presente estudo é pioneiro ao identificar a presença do ZIKV diretamente na aorta e também confirma sua presença no tecido cardíaco, contribuindo para o entendimento da distribuição viral em órgãos-alvo.

Complementando a avaliação da infecção sistêmica, investigou-se também a presença de esplenomegalia (aumento significativo do baço), alteração frequentemente associada a infecções agudas por arbovírus, uma vez que este órgão tem a função de remover células sanguíneas senescentes e prejudicadas da

circulação e iniciar as respostas imunes adaptativas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). No presente trabalho, como esperado, foi identificado aumento desse órgão estatisticamente superior no 5º dpi. De acordo com Aldulaimi & Mendez (2021), em infecções agudas é muito comum identificar o aumento desse órgão. Ren et al. 2022; Singh, et al. 2018 e Ab-Rahman et al. 2015 identificaram esplenomegalia em indivíduos infectados com dengue.

Tendo confirmado a esplenomegalia, indicativa de ativação imunológica sistêmica, procedeu-se à quantificação de citocinas plasmáticas para caracterizar o perfil inflamatório associado à infecção. Observou-se aumento de CCL5 e CCL2 na aorta e de CCL5 no plasma. Essas quimiocinas foram dosadas nesses locais, principalmente na aorta, pois alguns trabalhos na literatura já estudaram o aumento delas associados às doenças cardiovasculares. Xue et al. (2024), observaram que essas quimiocinas aumentadas induzem um grave problema cardiovascular, dissecção aórtica, causada por estresse de cisalhamento podendo levar o paciente à morte devido à ruptura da mesma (XUE et al., 2024). O aumento dessas quimiocinas também já foi relacionado em humanos em inflamação endotelial, hipertensão, aterosclerose e insuficiência cardíaca congestiva (TUCCI et al., 2006; MAJMUDAR et al., 2013; BEHR et al., 2000; RAVINDRAN et al., 2017). No trabalho realizado por Abdalla et al. (2018), os resultados de um paciente infectado por ZIKV no Brasil mostraram sintomas de fibrilação atrial e no soro desse paciente foi observado aumento de citocinas e quimiocinas (ABDALLA et al., 2018).

No coração dos animais do presente trabalho, essas quimiocinas não estavam aumentadas, diferente do que foi observado por Huang et al. (2023), em infecção aguda por SARS-CoV-2. Eles observaram aumento de CCL2 e citocinas pró-inflamatórias no coração de animais infectados (HUANG et al., 2023). A ausência de aumento de citocinas e quimiocinas no coração dos animais infectados por ZIKV no presente trabalho pode se dever ao inóculo viral utilizado e/ou ao tempo de infecção. Apesar de não encontrarmos aumento de mediadores pró-inflamatórios no coração, a presença viral nesse órgão, detectada por titulação viral, *per se*, pode causar lesões no tecido cardíaco.

As concentrações de outros mediadores pró-inflamatórios, como IL-1β, TNF e IL-6, não estavam aumentadas em nenhum grupo analisado nem na aorta, coração ou plasma. No estudo realizado por Costa et al. (2017), utilizando o mesmo modelo

experimental do presente trabalho, também não foi observado aumento das citocinas supracitadas no plasma em 3 e 5 dpi, sendo esse aumento detectado apenas no 6º dpi. Considerando que, no presente estudo, o tempo máximo de análise foi de 5 dpi, é possível que a elevação das citocinas ocorra em um momento posterior, não contemplado pela janela temporal analisada.

Considerando que o desequilíbrio no perfil de citocinas pode comprometer a integridade da barreira endotelial, foi avaliada a permeabilidade vascular como um marcador funcional de dano vascular associado à infecção. A infecção pelo ZIKV gerou aumento da permeabilidade vascular somente no rim, após 5 dpi, sugerindo disfunção da barreira endotelial renal. Não é incomum a detecção de aumento da permeabilidade vascular em processos inflamatórios/infecciosos, inclusive nas arboviroses. A maior parte das infecções por arbovírus, como Zika, Dengue e Chikungunya, pode gerar aumento da permeabilidade vascular e esse acometimento está relacionado com a gravidade da doença (LO et al., 2022; QIU et al., 2022). Puerta-Guardo et al. (2019), mostraram que a proteína NS1 dos vírus da dengue, zika, Nilo Ocidental, encefalite japonesa e febre amarela se liga seletivamente e altera a permeabilidade das células endoteliais humanas do pulmão, derme, veia umbilical, cérebro e fígado (PUERTA-GUARDO et al., 2019).

Porém, nem todas as infecções virais causam alterações na permeabilidade vascular. Essa alteração pode depender do tipo de vírus, do modelo experimental e do tecido analisado. Papa et al. (2017), observaram que a infecção por ZIKV em camundongos A129 não alterou a permeabilidade endotelial. Para alcançar o SNC, o ZIKV atravessa a barreira hemato encefálica por transcitose ou transinfecção após infecção e ativação das células endoteliais e não por aumento da permeabilidade endotelial (PAPA et al., 2017). Alimonti et al. (2018) e Leda et al. (2019), também observaram semelhanças com o trabalho desenvolvido por Papa et al. (2017), em que ZIKV pode infectar células endoteliais cerebrais sem comprometer a integridade ou permeabilidade da barreira (PAPA et al., 2017; ALIMONTI et al., 2018; LEDA et al., 2019). No presente trabalho, observou-se aumento de permeabilidade vascular somente no tecido renal. É a primeira vez que um trabalho sobre infecção por arbovírus observa essa alteração nesse tecido.

Uma vez que foi observado aumento na permeabilidade vascular nos rins, investigou-se se a função renal se encontrava alterada em função da infecção por

ZIKV. No presente trabalho, a infecção aguda por ZIKV aumentou a dosagem plasmática de creatinina, mas não de ureia, o que é compreensível, já que a creatinina sérica é a verdadeira ferramenta de avaliação da função renal (STARK, 1998). Liu e colaboradores (2019) também detectaram aumento na dosagem de creatinina em camundongos infectados por ZIKV a partir do 7º dpi em recém nascidos e adultos. Em pacientes infectados por SARS-CoV-2, os níveis séricos aumentados de creatinina correlacionaram-se direta e similarmente com o desfecho desfavorável para a doença, devido à disfunção renal (KÖRTVELYESSY et al., 2023). Há uma escassez na literatura de trabalhos que estudaram a disfunção renal causada por infecção por arboviroses. Entretanto, Campos et al. (2021), realizaram a avaliação urológica em crianças (2 a 4 anos de vida) com microcefalia associada a infecção congênita por ZIKV. Essas crianças apresentaram bexiga imatura e reflexa, mas sem impacto renal até o momento, o que não exclui repercussões na função renal a longo prazo (CAMPOS et al., 2021). O aumento de creatinina observado no grupo controle em 5 dpi foi inesperado. Uma possível explicação para essa diferença estatística entre os grupos controles, pode ter sido a presença de hemólise em algumas amostras no grupo MOCK 5D que pode ter elevado artificialmente os valores medidos. Além disso, outros fatores pré-analíticos, como variações durante a coleta ou processamento das amostras, também podem ter contribuído para o resultado.

Já foi visto que o ZIKV pode infectar células dos glomérulos e também células epiteliais dos túbulos proximais renais, podendo servir como potenciais reservatórios para o ZIKV no rim (CHEN et al., 2017). É possível que a ureia plasmática tenha se elevado nos primeiros dias de infecção, mas não permaneceu elevada, provavelmente devido à sua cinética rápida. Além disso, por não ter sido visualizada alteração nos níveis de ureia, sugere-se lesão restrita aos túbulos, sem envolvimento funcional sistêmico, a nível glomerular, por exemplo. Acredita-se que ocorreram alterações hemodinâmicas antecipadamente e posteriormente progrediu para uma lesão estrutural, prejudicando, possivelmente, a filtração renal, elevando a creatinina em 3dpi, uma vez que esse marcador tem um tempo maior para se elevar.

O trabalho desenvolvido por Liu et al. (2019), mostrou que o ZIKV apresentou alta agressividade às células epiteliais renais e a infecção causada pelo vírus induziu lesão renal aguda causando lesão tubular, inflamação descontrolada e apoptose de

células renais em camundongos recém-nascidos e também em adultos. O trabalho acima citado corrobora com o que foi encontrado no presente trabalho. Acredita-se que o aumento de celularidade tubular e intersticial sejam em resposta a uma lesão viral direta no rim, além de uma resposta imunológica exacerbada, não podendo descartar hipóxia, uma vez que foi identificado aumento de extravasamento plasmático nos rins e a diminuição de oxigenação pode ocorrer após uma redução no fluxo renal. Apesar da ocorrência de lesão renal, não se observou deposição de colágeno por meio da coloração de Picrosírius tanto total quanto tubular. Esse resultado difere do que foi visto por Liu et al. (2019) em que observaram fibrose intersticial por coloração de Masson em 14 dpi após infecção por ZIKV, ou seja, mais tempo de infecção do que a realizada no presente trabalho. Essa ausência de deposição de colágeno sugere que o processo ainda se encontra na fase inflamatória aguda, sem remodelamento crônico da matriz extracelular.

Além da função renal, outros parâmetros clínicos cardiovasculares foram analisados, tendo em vista que infecções sistêmicas podem impactar diretamente a hemodinâmica do organismo. Portanto, avaliou-se a pressão arterial sistólica e frequência cardíaca. No 3º dpi identificou-se hipotensão arterial sistólica que foi revertida no 5º dpi. Ainda são escassas as pesquisas que estudaram a pressão arterial em infecção por ZIKV. Porém, a hipótese é que há liberação de substâncias vasodilatadoras provocando redução da resistência periférica e aumento da permeabilidade vascular, esta última como visto por Kangussu et al. (2021) em infecção aguda DENV. Essas alterações poderiam levar à hipotensão arterial e hipovolemia. Kularatne et al. (2018), em uma pesquisa clínica com humanos infectados por DENV, apresentaram hipotensão persistente, além de outras complicações cardiovasculares. Kularatne et al. (2007), em outra pesquisa, também foi observado hipotensão (23% dos casos estudados). Yeung et al. (2020), estudando também humanos, visualizaram hipotensão em infecção grave por DENV. A recuperação da pressão arterial no 5º dpi pode ser um mecanismo compensatório frente a hipotensão arterial sistólica detectada no 3º dpi, por exemplo por barorreflexo, para manter a perfusão tecidual, o que necessitaria de investigação. A respeito da frequência cardíaca (FC), não houve diferença estatística entre os grupos no presente trabalho. Li et al. (2022), observaram uma FC mais lenta em camundongos A129 infectados com ZIKV (avaliaram em 3 e 6 dpi). La-Orkhun et al. (2011), ao estudar a

infecção por DENV em crianças, também não identificaram alterações significativas na FC.

Considerando que a função cardiovascular envolve tanto parâmetros hemodinâmicos quanto elétricos, a próxima etapa consistiu na avaliação eletrocardiográfica, com o intuito de identificar possíveis alterações de ritmo e condução associadas à infecção viral. Foi observado aumento da duração da onda P, mas sem alteração na amplitude desta. Também foi visualizado aumento na duração do intervalo PR, o que sugere uma má condução elétrica no coração por um bloqueio atrioventricular de primeiro grau. As possíveis causas dessa disfunção elétrica podem estar relacionadas a fatores previamente observados, como a inflamação local e a infecção direta dos cardiomiócitos pelo vírus, que poderiam comprometer a excitabilidade do miocárdio e, consequentemente, alterar a condução elétrica cardíaca. Li et al. (2022), em 6 dpi, também observaram alteração no complexo QRS e prolongamento do intervalo PR, podendo indicar bloqueios na condução e futuramente levar a sequelas fatais. Minhas et al. (2017), estudou pacientes positivos para ZIKV que apresentaram elevação do segmento ST, arritmias e insuficiência cardíaca. Carta et al. (2017), observaram que 88,9% dos pacientes estudados, infectados por ZIKV, apresentaram arritmia no eletrocardiograma. Obeyesekere & Hermon (1972), também visualizaram alterações importantes no eletrocardiograma de pacientes que foram infectados por dengue e chikungunya, como alterações no segmento ST e na onda T, taquicardia sinusal entre outras alterações, principalmente após um certo tempo da infecção, algo como uma sequela. Wali et al. (1998), observaram que 30% dos pacientes da pesquisa, que foram infectados por DENV, apresentaram alteração no eletrocardiograma no intervalo ST e onda T. Kularatne et al. (2007), em uma pesquisa clínica observaram que 62,5% dos pacientes relacionados, apresentavam alterações eletrocardiográficas (inversão T e alteração de ST). La-Orkhun et al. (2011) e Kabra et al. (1998), assim como no presente trabalho, também observaram bloqueio atrioventricular de primeiro grau, porém em pacientes infectados com DENV (LA-ORKHUN et al., 2011; KABRA et al., 1998).

No presente trabalho, também foi observado aumento da duração do intervalo QT, mas não do QTc. Como o QTc é corrigido pela frequência cardíaca, a ausência de alteração neste parâmetro sugere que o prolongamento do QT seja predominantemente dependente da bradicardia. Ressalta-se, porém, que a captação

do eletrocardiograma em animais conscientes pode elevar a frequência cardíaca devido ao estresse, o que pode ter influenciado a análise absoluta dos intervalos. Alguns trabalhos na literatura já relacionaram infecções por ZIKV em humanos ao prolongamento de QTc (VILLAMIL-GÓMEZ et al., 2018). Além da ZIKV, pacientes com HIV também podem ser mais propensos à morte súbita cardíaca, com possíveis mecanismos incluindo prolongamento do intervalo QTc (TSENG et al., 2022). Também na COVID-19, em pacientes humanos, foi observado prolongamento desse parâmetro na fase aguda (LU et al., 2024). A elevação do QTc é de grande importância clínica, uma vez que pode predispor a arritmias que podem ser fatais, como Torsades de Pointes (MYERSON et al., 2019). O significado fisiopatológico do prolongamento do intervalo QT é um atraso no processo de repolarização ventricular e ele pode estar relacionado com inflamação e infecção (MINHAS et al., 2017), desregulação de junções do tipo GAP que alteram a condução e repolarização, como por exemplo a perda de conexinas (conexina 43) (LI, S. et al., 2022), bem como a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a geração de estresse oxidativo que podem alterar canais iônicos para sódio, potássio e cálcio e esses, também, favorecem o prolongamento da repolarização (STEINKE et al., 2013; BAI et al., 2011).

Como citado anteriormente, processos infecciosos e inflamatórios podem predispor esses atrasos como a miocardite e lesão miocárdica. No presente estudo observamos um aumento da fração MB da enzima creatinofosfoquinase (CK-MB) foi muito útil pois ela se encontra principalmente no miocárdio e é um bom marcador diagnóstico de dano miocárdico (PARK et al., 2013). No presente trabalho, a atividade plasmática da CK-MB estava aumentada no 5º dpi. Esse resultado corrobora com Li e colaboradores (2022), que testaram a cepa asiática do ZIKV em camundongos A129, como a linhagem geneticamente modificada utilizada no presente trabalho, observou-se aumento da atividade plasmática da CK-MB a partir do 6º dpi, mas não no 4 dpi (LI et al., 2022).

Outras infecções virais, como a causada por SARS-CoV-2 em pacientes pediátricos, também elevou os níveis de CK-MB (WANG; HU; CHEN, 2021). Além do COVID-19, pacientes infectados por dengue vírus também tiveram CK-MB aumentados (GIRDHAR et al., 2017; LI et al., 2016).

Após detecção da alteração atividade elétrica cardíaca e do aumento da dosagem de CK-MB, que é bom marcador de dano miocárdico, investigou-se a função

mecânica do coração, a fim de verificar se a infecção por ZIKV também comprometeria o desempenho contrátil do miocárdio. Os testes funcionais de Langendorff, no presente trabalho, mostraram que a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) se encontrava aumentada em animais infectados ainda no estado basal e permaneceu aumentada após estímulo farmacológico com isoprenalina em 3 dpi. Esse resultado corrobora com o da derivada da pressão em função do tempo máxima e mínima, que novamente em um estado basal, o coração de animais infectados já era superior e se manteve elevado durante a curva para isoprenalina. Portanto, a função cardíaca se encontra alterada e a hipótese é que há um excesso de cálcio (Ca^{2+}) no citosol devido à downregulation da Ca^{2+}-ATPase (SERCA) do retículo sarcoplasmático ou upregulation de fosfolambam, provocando hipercontratilidade cardíaca. Lyon et al. (2011) e Kumarswamy et al. (2012), observaram que corações com insuficiência cardíaca podem apresentar prejuízos na SERCA impedindo o funcionamento adequado de recaptação de Ca^{2+}. De acordo com Paonessa et al. (2015), uma hipovolemia, pode levar a esse estágio hiperdinâmico do ventrículo esquerdo. No 3º dpi foi visualizada hipotensão sistólica, sugerindo que há hipovolemia no animal infectado. Jones et al. (2005), observou que a presença de uma função ventricular hiperdinâmica em uma situação de choque séptico, por exemplo, é vista como um mecanismo compensatório de vasodilatação por reduzir o enchimento ventricular. No presente trabalho, acredita-se que essa resposta hipercontrátil cardíaca observada seja um estágio precoce de disfunção miocárdica compensatória, que pode não se sustentar a longo prazo. Corroborando totalmente com os resultados obtidos pelos testes funcionais cardíacos por Langendorff, a contratilidade dos cardiomiócitos de animais infectados também se encontrava alterada. Tanto no 3º dpi quanto no 5º dpi, as células cardíacas apresentam uma fração de encurtamento aumentada, sem alteração no tempo que os cardiomiócitos levam para atingir o pico máximo de contração. Porém, o tempo de repolarização estava aumentado no 3º dpi, nos cardiomiócitos de animais infectados levando mais tempo para relaxar enquanto no 5º dpi esse tempo estava normal. A hipótese continua sendo excesso de Ca^{2+} no citoplasma e uma adaptação no 5º dpi.

O aumento de contratilidade do cardiomiócito, identificada no 3º e 5º dpi está relacionado ao aumento do transiente de cálcio evidenciado pela maior amplitude quando estimulados eletricamente. Além disso, o decaimento nas células de animais

infectados era mais lento que as dos controles e a liberação do cálcio atrasada. Essas alterações na dinâmica do cálcio podem ser comuns em infecções virais por vias inflamatórias ou causadas diretamente pela presença viral. Porém há uma escassez importante na literatura de trabalhos relacionando esse impacto celular cardíaco do cálcio com arboviroses. Num contexto agudo, como é o do presente trabalho, uma pesquisa realizada em cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos (hiPSC-CMs), infectadas por SARS-CoV-2, demonstrou impacto do vírus na contratilidade ao cálcio, porém eles observaram redução dessa resposta e não aumento, como no presente trabalho (SHARMA et al., 2020).

Achados semelhantes a esses (alteração na contratilidade e na dinâmica do cálcio) foram identificados em trabalhos que estudaram a infecção viral por HIV em macacos Rhesus mediada por CCR5, prejudicando a função contrátil dos cardiomiócitos (KELLY et al., 2014). A partir desse impacto inflamatório já discutido, é plausível a hipótese que essa via acionada pelo receptor CCR5 possa também estar envolvida no presente trabalho. Sugere-se que a infecção aguda por ZIKV cause hipercontratilidade cardíaca inicial por meio de um mecanismo envolvendo a ativação da via CCR5–PKA, culminando em disfunção da recaptura de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Entretanto, não há na literatura trabalhos que demonstraram que a ativação de CCR5 em células cardíacas pode ativar cascatas inflamatórias interferindo na fosforilação de proteínas reguladoras da homeostase do cálcio, como fosfolambam (PLN). Contudo, já é bem discutido que a fosforilação de PLN via PKA normalmente desinibe a bomba SERCA2a, favorecendo a recaptura de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático (BERS, 2008; ARNOLD et al., 2021). No entanto, danos à função da SERCA ou à regulação do PLN, como já descritos em modelos de insuficiência cardíaca (HAJJAR et al., 1998; LOU; JANARDHAN; EFIMOV, 2012), podem levar a acúmulo de Ca^{2+} no citosol, aumento da amplitude dos transientes e retardo no seu decaimento, como observado nos animais infectados do presente trabalho. Essa sobrecarga de Ca^{2+} citoplasmático favorece o aumento da contratilidade no curto prazo, mas pode evoluir para disfunção diastólica, arritmias e falência miocárdica caso persistam o estresse inflamatório ou o vazamento de Ca^{2+} pelo RyR2 (HITOSHI et al., 2016). Assim, propõe-se que a ativação de CCR5 interfere indiretamente na regulação do acoplamento excitação-contração, promovendo um desequilíbrio nos mecanismos de recaptura e liberação de Ca^{2+} intracelular.

A infecção aguda por ZIKV afeta de forma importante o coração aumentando a contratilidade e prejudicando o relaxamento. No presente trabalho, na vasculatura aórtica, não foi identificada alteração na contração induzida pelo agente contrátil despolarizante, cloreto de potássio (KCl), sugerindo que não há comprometimento do músculo liso vascular pela infecção por ZIKV.

Situação diferente foi descrita por Heesen; Hotchkiss; Karl (1994) no modelo de sepse, induzido por ligadura e perfuração cecal (CLP). Nesse modelo de sepse, em 24 horas, os autores observaram redução da resposta contrátil para KCl e para fenilefrina, um agonista de receptores alfa 1 adrenérgico.

Corroborando com a hipótese traçada no presente trabalho, na reatividade vascular aórtica a infecção causou hiporreatividade em curva concentração-resposta para o agonista fenilefrina no 5º dpi, em aortas intactas, semelhante ao que observou (RIBEIRO et al., 2025), na sepse aguda (6h). No 3º dpi não há diferença estatística entre os grupos. A hiporreatividade aórtica está muito relacionada em situações infecciosas como na sepse, causada pelo método de ligadura e perfuração do ceco (CLP) (YADAV et al., 2022; RIBEIRO et al., 2025).

Uma vez que não foi identificada alteração no músculo liso vascular, mas que a infecção por ZIKV causou redução da contração vascular aórtica em 5 dpi, induzida por fenilefrina, investigou-se se o endotélio contribuía para a hiporresponsividade aórtica visualizada, removendo mecanicamente esse tecido. Assim, observou-se que na ausência do endotélio, a hiporreatividade visualizada anteriormente, na presença desse tecido foi revertida, demonstrando que o endotélio participa, de forma importante, da hiporreatividade aórtica na infecção aguda por ZIKV por, provavelmente, liberar mediadores que prejudiquem a contração induzida por fenilefrina.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que estudaram o impacto da infecção por ZIKV na função vascular, podendo, o presente trabalho, contribuir para preencher essa importante lacuna. Entretanto, de forma semelhante, estudando outra arbovirose, a infecção por chikungunya, Oliveira-Neto e colaboradores (2024), demonstraram papel semelhante do endotélio recuperando a hiporreatividade aórtica anteriormente causada pela infecção por CHIKV.

Uma vez que a ZIKV causou hiporreatividade aórtica à fenilefrina em 5 dpi e que essa resposta é endotélio-dependente, investigou-se os mecanismos envolvidos.

No presente trabalho, a quimiocina CCL5 estava aumentada em aortas e no plasma em 5 dpi. A quimiocina CCL5 já foi relacionada com disfunção endotelial em aortas. No trabalho realizado por Costa et al. (2023), aortas incubadas com CCL5 apresentaram disfunção endotelial grave, que foi prevenida pelo bloqueio de Nox1, NFκB e com antagonista de CCR5 (Maraviroc) (COSTA et al., 2023). No presente trabalho, ao incubar as aortas com o antagonista do receptor CCR5, Maraviroc, observou-se reversão da hiporreatividade vascular. Acredita-se que nas células endoteliais de animais infectados, o aumento da quimiocina CCL5 induzida pela infecção interage com os receptores CCR5, levando à ativação da enzima ciclooxigenase (COX). Christmann et al. (2011) mostraram que a presença de CCR5 é necessária para a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP) estimulada pelo vírus da encefalomiocardite e do fator nuclear kappa B (NF-κB) e a subsequente expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível por genes inflamatórios (iNOS) e ciclooxigenase 2 (COX-2) (CHRISTMANN et al., 2011).

Para confirmar o envolvimento de COX na hiporreatividade vascular gerada por ZIKV, como relata a literatura acima citada, podendo ser ativado por CCL5, investigou-se o envolvimento das duas isoformas da COX (isoformas 1 e 2). A incubação para Mofezolac (inibidor seletivo COX-1) mostrou a participação dessa isoforma na hiporreatividade vascular, bem como a participação de COX-2, em presença de Celecoxibe (inibidor seletivo COX-2), uma vez que ambas aumentaram a contração para PE. De acordo com Ozer *et al.* (2017), Celecoxibe reverteu a hiporreatividade à PE em aortas de ratos sépticos.

Uma vez que a COX participa da hiporreatividade à fenilefrina e que um dos eicosanoides derivados da sua ação é a prostaciclina (PGI_2) — um potente vasodilatador (MITCHELL; KIRKBY, 2018) —, investigou-se também a participação desse mediador na hiporreatividade observada. No presente trabalho, demonstrou-se que a ativação dos receptores para prostaciclina (PGI_2) desempenha um papel fundamental na hiporreatividade aórtica durante a infecção aguda pelo Zika vírus, evidenciado pela reversão dessa resposta após incubação com o antagonista do receptor de prostaciclina. Esse achado difere, em parte, do observado por Araújo et al. (2011), em sepse aguda, uma vez que durante a sepse eles atribuíram a hiporreatividade aórtica não apenas ao óxido nítrico (NO), mas também à prostaciclina.

Além da participação crucial dos receptores de PGI_2, é pertinente questionar se a hiporreatividade à fenilefrina também poderia estar relacionada à diminuição da expressão gênica dos α-adrenoceptores na aorta de camundongos infectados pelo ZIKV, como descrito por Kandasamy et al. (2011) em modelos de sepse.

Considerando que a PGI_2 poderia aumentar monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e ativar a proteína quinase A (PKA) (JASCHONEK et al., 1988) e essa enzima promover vasodilatação (FETALVERO et al., 2006; STITHAM et al., 2004), realizou-se a incubação com o inibidor da enzima PKA para verificar a participação dela no processo de hiporreatividade vascular causada pela infecção. Na presença desse inibidor observou-se reversão da hiporresponsividade à fenilefrina.

Desse modo, a elevação dos níveis de CCL5 no plasma e na aorta de animais infectados pelo ZIKV pode estar associada ao recrutamento de leucócitos, haja vista o aumento na contagem total de leucócitos observado no presente trabalho no 5º dpi, o que pode contribuir para a disfunção vascular identificada. A alteração do tônus vascular aórtico induzida pela infecção, caracterizada por hiporresponsividade à fenilefrina, foi revertida pela administração de antagonista de CCR5, inibidores das isoformas COX-1 e COX-2, antagonista do receptor de prostaciclina e inibidor da PKA, indicando a participação de mecanismos inflamatórios e endoteliais. Esses achados sugerem que o eixo CCR5–COX–prostaciclina-PKA pode representar um potencial alvo terapêutico durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV. Não há na literatura trabalhos que investiguem diretamente o eixo CCR5–COX–prostaciclina-PKA em arboviroses, revelando a inovação mecanicista que o presente trabalho propõe. Entretanto, já se estudou cada um dos elementos desse eixo, separadamente, em outras arboviroses e outras infecções e os resultados do presente estudo sobre o envolvimento desse eixo corroboram com os resultados da literatura nesses processos infecciosos/inflamatórios, como é o caso de infecções respiratórias virais desencadeados pela influenza em que a produção de prostaglandinas é aumentada, incluindo prostaciclina que auxilia no processo infeccioso viral. A inibição da COX pode reduzir a replicação viral e a resposta inflamatória, (MCCARTHY; WEINBERG, 2012) além de reduzir níveis de RNAm, e também de proteínas (SCHRÖER; SHENK, 2008). Machado et al. (2005), observaram que CCR5 e seus ligantes são fundamentais para gerar miocardite e proteção do hospedeiro em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi.* Investigações futuras que abordem a relação

CCR5–COX–prostaciclina-PKA são necessárias pois podem oferecer base sobre os mecanismos patogênicos comuns e potenciais alvos terapêuticos.

Além desse tão importante eixo, outros trabalhos na literatura correlacionam a hiporreatividade à sepse ou a endotoxemia (SINGH et al. 2022; ZHAO et al., 2019; PERNOMIAN et al., 2016; ARAÚJO et al., 2012; KANDASAMY et al., 2011), ao óxido nítrico (NO) (SINGH et al., 2022; PERNOMIAN et al., 2016; ARAÚJO et al., 2012; KANDASAMY et al., 2011). Porém, surpreendentemente, o NO não está envolvido na resposta hiporresponsiva, contrapondo os principais trabalhos na área.

Esses resultados demonstram a relevância de vias inflamatórias específicas na disfunção vascular induzida pelo ZIKV, mas também levantam a hipótese de que fatores biológicos, como o sexo, podem modular essas respostas. Observou-se, então, que existe dimorfismo sexual nos sinais clínicos causados pela infecção por ZIKV na massa corporal e pressão arterial sistólica (PAS). Os machos apresentaram perda importante de massa corporal, entretanto, as fêmeas perderam massa corporal somente no 3º dpi com recuperação da massa no 5º dpi e não apresentaram alteração na PAS, enquanto os machos apresentaram redução da pressão no 3º dpi. Além disso, possivelmente a proteção hormonal também influenciou a proteção vascular das fêmeas na reatividade vascular na infecção aguda por ZIKV, diferente dos machos, que apresentaram um prejuízo na resposta contrátil à fenilefrina. Os achados do presente trabalho são opostos ao encontrado por Martin et al. (2023), que mostram maior morbidade e mortalidade por infecção por influenza em mulheres em comparação com homens. Porém, corrobora que existe dimorfismo sexual, ainda que as mulheres apresentam pior morbidade. Em contrapartida, alguns trabalhos na literatura mostraram que a gravidade e a mortalidade da doença do coronavírus 2019 (COVID-19) são maiores em homens do que em mulheres, corroborando com os resultados do presente trabalho. Em muitos casos, essa gravidade está relacionada com a geração de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos e uma proteção feminina por aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias (OLIVERA MITROVIĆ-AJTIĆ et al., 2023). Em comunhão com o trabalho anterior, já foi observado que o estrogênio contribui para a diminuição do estresse oxidativo em mulheres e sugere maior proteção feminina contra doenças cardiovasculares e insuficiência cardíaca do que os homens (RATTANASOPA et al., 2015; (WANG et al., 2015). Assim como fatores biológicos, como o sexo, influenciam a resposta à infecção

por ZIKV, a infecção durante a gestação também representa um cenário particular, com implicações importantes para o desenvolvimento fetal. A infecção congênita pelo ZIKV tem sido associada a desfechos neurológicos graves desde 2016, mas ainda pouco se sabe sobre os possíveis efeitos cardiovasculares na prole exposta ao vírus, o que reforça a necessidade de estudos como o presente.

Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a infecção por ZIKV uma emergência internacional em função dos altos índices de microcefalia em áreas endêmicas (GULLAND, 2016). O Brasil foi o país que ocorreu a maior epidemia por esse vírus nas Américas e onde foram realizadas as primeiras notificações do de microcefalia associada à infecção pelo vírus (Barreto et al., 2016).

Infelizmente, a microcefalia é apenas uma das possíveis complicações encontradas em indivíduos expostos ao ZIKV durante a gravidez, gerando a síndrome congênita do Zika (SCZ) (MIRANDA-FILHO et al., 2016; (MARTINES et al., 2016). Além de danos neurológicos desencadeados pela infecção congênita por ZIKV, levantou-se a hipótese no presente trabalho, que animais cujas mães foram infectadas por ZIKV na gestação apresentam também alterações vasculares. A patogenicidade do ZIKV não se restringe aos danos observados logo após o nascimento. Há evidências convincentes de impactos a longo prazo (ALMEIDA et al., 2023).

Portanto, na prole adulta (machos), a infecção congênita causou o oposto visto na infecção aguda. Foi observada uma hiperreatividade à fenilefrina em camundongos machos adultos, cujas mães foram infectadas por ZIKV durante a gestação. As fêmeas não apresentaram alteração, sugerindo proteção hormonal. Há uma escassez de trabalhos na literatura que relacionem a infecção congênita por ZIKV com a investigação de alterações cardiovasculares na prole. No trabalho desenvolvido por Tai et al. (2019), observaram em camundongos A129 prenhes transfundidos com plasma ZIKV^{+} uma infecção placentária grave com dano vascular e apoptose, infecção e dano fetal, acompanhada de morte no feto e filhote.

No presente trabalho, foi observada uma hiperresponsividade à fenilefrina nas aortas de animais cujas mães foram infectadas por ZIKV durante a gestação. Levanta-se a hipótese de que esse aumento na reatividade vascular esteja relacionado à maior geração de espécies reativas de oxigênio, em especial o ânion superóxido, possivelmente produzido em maior quantidade pela atividade do complexo enzimático

NADPH oxidase. Até o momento, não foram encontrados trabalhos na literatura com essa temática na reatividade vascular para embasar ou refutar essa hipótese, porém, já é sabido que a infecção congênita pelo ZIKV gera estresse oxidativo na prole no sistema nervoso central (ALMEIDA et al., 2023). Logo, esse estresse oxidativo também poderia ocorrer em demais sistemas como no sistema cardiovascular, já que o vírus já foi detectado nesse sistema. Também não foram encontrados trabalhos que estudaram alterações nos parâmetros cardiovasculares entre machos e fêmeas nesse cenário de SCZ para verificar o papel do dimorfismo sexual. Porém, Valentine et al. (2018) avaliaram o potencial envolvimento do gênero no impacto da gravidade do fenótipo nos resultados da prole de mães infectadas por ZIKV. Os animais machos, expostos ao vírus no meio da gestação, apresentaram redução no diâmetro biparietal e no peso corporal na adolescência, enquanto as fêmeas mostraram alterações menos pronunciadas. Corroborando, potencialmente, com a proteção hormonal visualizada nas fêmeas no presente trabalho.

7. Conclusão

A infecção aguda pelo ZIKV causou importante morbidade, caracterizada por intensa resposta inflamatória visualizada por leucocitose, predominantemente granulócitos, esplenomegalia, disfunção renal e presença viral no plasma, coração e aorta. A infecção também reduziu a pressão arterial sistólica, gerou disfunção na condução elétrica cardíaca, evidenciada por bloqueio atrioventricular de primeiro grau e aumento da contratilidade cardíaca, além de elevação dos níveis de CK-MB. A hipercontratilidade cardíaca observada na infecção aguda pode representar um estágio precoce de disfunção miocárdica compensatória, que pode ser transitória, possivelmente induzida pela ativação do eixo CCR5–COX–prostaciclina–PKA, capaz de promover sobrecarga de cálcio no citoplasma por um prejuízo na ação de SERCA/Fosfolamban.

A presença do ZIKV na aorta também contribuiu para a inflamação vascular e a hiporresponsividade à fenilefrina, mediada pela via CCR5–COX–prostaciclina–PKA, cuja intervenção farmacológica reverteu a disfunção vascular. A infecção por ZIKV não impactou a reatividade vascular nas fêmeas, sugerindo uma proteção hormonal. Na infecção congênita, a resposta vascular foi de hiperresponsividade à fenilefrina, de forma surpreendente, sugerindo o envolvimento de mecanismos distintos. Os

resultados sugerem que a ativação desse eixo inflamatório pode impactar não apenas o tônus vascular, mas também a função elétrica e contrátil do coração durante a fase aguda da infecção. Dessa forma, o presente trabalho contribui para esclarecer alguns dos mecanismos ainda pouco explorados na infecção aguda pelo ZIKV, destacando o impacto desta infecção no sistema cardiovascular.

8. Limitações

É importante considerar algumas limitações inerentes ao presente estudo. Em primeiro lugar, a natureza do objeto de estudo exigiu o uso de duas linhagens de camundongos distintas para investigar a infecção aguda e a congênita. Embora esta abordagem tenha sido necessária, pois os animais KO não sobreviveriam ao período gestacional, e a linhagem C57Bl/6J não desenvolve manifestações graves da doença devido à sua resistência. Logo, a possibilidade de que diferenças fisiológicas intrínsecas entre as linhagens possam ter influenciado os resultados não pode ser totalmente descartada.

Adicionalmente, os registros de eletrocardiograma foram realizados em animais conscientes, um procedimento no qual o estresse do manejo pode ter influenciado parâmetros como a frequência cardíaca.

Por fim, o estudo focou nas respostas contráteis vasculares, não tendo investigado o impacto da infecção pelo ZIKV no relaxamento vascular mediado pelo endotélio. Dada a evidente importância da camada endotelial nas respostas contráteis demonstradas no presente trabalho, a avaliação da função de relaxamento representa uma perspectiva importante para estudos futuros.

9. Referências

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular.** 6. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

ABDALLA, L. et al. Atrial fibrillation in a patient with Zika virus infection. **Virology Journal**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-6, 25 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s12985-018-0938-2.

AB-RAHMAN, H. *et al.* Dengue death with evidence of hemophagocytic syndrome and dengue virus infection in the bone marrow. **Springerplus**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-6, 2 nov. 2015. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s40064-015-1463-z.

ADANE, T.; GETAWA, S. Coagulation abnormalities in dengue fever infection: a systematic review and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 1-16, 18 ago. 2021. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0009666.

ALDINUCCI, D.; BORGHESE, C.; CASAGRANDE, N. The CCL5/CCR5 Axis in Cancer Progression. **Cancers**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 1765, 2 jul. 2020. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/cancers12071765.

ALDULAIMI, S.; MENDEZ, A. M. Splenomegaly: Diagnosis and Management in Adults. **American Family Physician**, v. 104, n. 3, p. 271–276, 1 set. 2021.

ALETTI, M et al. Transient myocarditis associated with acute Zika virus infection. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], p. 678-679, 10 dez. 2016.

ALIMONTI, J. et al. Zika virus crosses an in vitro human blood brain barrier model. **Fluids and Barriers of the CNS**, [online] 15(1). 2018. https://doi.org/10.1186/s12987-018-0100-y.

ALMEIDA, W. et al. Zika Virus affects neurobehavioral development, and causes oxidative stress associated to blood–brain barrier disruption in a rat model of congenital infection. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 112, p. 29-41, ago. 2023. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2023.04.014.

ALVAREZ, M. et a. Cardiovascular involvement and manifestations of systemic Chikungunya virus infection: a systematic review. **F1000Research**, [S.L.], v. 6, p. 1-22, 2 maio 2017.

ANDRADE, A. *et al.* Hematological Profile of Pregnant Women with Suspected Zika Virus Infection Followed Up at a Referral Service in Manaus, Brazil. **Viruses**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 1-11, 20 abr. 2021. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/v13040710.

ANDRADE, C. ZIKV Disrupts Placental Ultrastructure and Drug Transporter Expression in Mice. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, p. 1-19, 21 maio 2021. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.680246.

ARAÚJO, A. *et al.* Augmented nitric oxide production and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase during cecal ligation and perforation. **Nitric Oxide**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 59-66, jun. 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2012.04.005.

ARAÚJO, A. *et al.* Prostacyclin, not only nitric oxide, is a mediator of the vasorelaxation induced by acetylcholine in aortas from rats submitted to cecal ligation and perforation (CLP). **Vascular Pharmacology**, [S.L.], v. 54, n. 1-2, p. 44-51, jan. 2011. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2010.12.002.

ARNOLD, M. et al. SERCA2a-phospholamban interaction monitored by an interposed circularly permutated green fluorescent protein. **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**, [S.L.], v. 320, n. 6, p. 2188-2200, 1 jun. 2021. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00858.2020.

BAI, C. et al. Zika virus induces myocardial immune response and myocarditis in mice. **Journal Of Molecular And Cellular Cardiology**, [S.L.], v. 148, p. 103-105, nov. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.08.014.

BAI, Y. et al. HIV Tat protein inhibits hERG K+ channels: a potential mechanism of hiv infection induced lqts. **Journal Of Molecular And Cellular Cardiology**, [S.L.], v. 51, n. 5, p. 876-880, nov. 2011. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.07.017.

BANDYOPADHYAY et al. Cardiovascular implications of Zika virus infection. **European Journal Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 52, p. 35-36, jun. 2018.

BANERJEE, A. et al. CAMP Signaling Enhances HIV-1 Long Terminal Repeat (LTR)-directed Transcription and Viral Replication in Bone Marrow Progenitor Cells. **Clinical Medicine Insights**: Pathology, [S.L.], v. 10, p. 1-8, 1 jan. 2017. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1177/1179555717694535.

BARRETO, M. L. et al. Zika virus and microcephaly in Brazil: A scientific agenda. **Lancet.** Londres, v. 387, n. 10022, p. 919-21, 2016.

BATISTA, V. et al. P2Y12–P-Selectin Mediated Platelet Activation Drives Dengue-Associated Thrombocytopenia. **Biorxiv**, [S.L.], p. 1-25, 12 set. 2025. Cold Spring Harbor Laboratory. http://dx.doi.org/10.1101/2025.09.08.674864.

BEHR, T. et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1 is Upregulated in Rats With Volume-Overload Congestive Heart Failure. **Circulation**, [S.L.], v. 102, n. 11, p. 1315-1322, 12 set. 2000. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.102.11.1315.

BELL, R. M.; MOCANU, M. M.; YELLON, D. M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. **J Mol Cell Cardiol**, 50, n. 6, p. 940-950, Jun 2011.

BERS, D. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. **Annual Review Of Physiology**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 23-49, 1 mar. 2008. Annual Reviews. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455.

BRAGA, J. *et al.* Accuracy of Zika virus disease case definition during simultaneous Dengue and Chikungunya epidemics. **Plos One**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 179725, 26 jun. 2017. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0179725.

BRANCHE, E *et al*. Human Polyclonal Antibodies Prevent Lethal Zika Virus Infection in Mice. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-12, 8 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-46291-9.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Boletim epidemiológico: volume 55, nº 05.* Brasília: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-05. Acesso em: 20 mar. 2025.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 375, n. 24, p. 2321-2334, 15 dez. 2016. Massachusetts Medical Society. http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1602412.

BRITO, C. **View of Zika Virus: A New Chapter in the History of Medicine**. Disponível em: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/7341/4565>. Acesso em: 27 set. 2025.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 653-660, jun. 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(16)00095-5.

CAMPOS, Â. Urological profile of children with microcephaly and congenital zika syndrome. **Journal Of Pediatric Urology**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 1-5, abr. 2021. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpurol.2020.10.011.

CAMPOS, G; BANDEIRA, A.; SARDI, S. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 21, n. 10, p. 1885-1886, out. 2015. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). http://dx.doi.org/10.3201/eid2110.150847.

CARTA, K. et al. MYOCARDITIS, HEART FAILURE AND ARRHYTHMIAS IN PATIENTS WITH ZIKA. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 11, p. 906, mar. 2017.

CHAN, O. et al. The Chemokine CCL5 Regulates Glucose Uptake and AMP Kinase Signaling in Activated T Cells to Facilitate Chemotaxis. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 287, n. 35, p. 29406-29416, ago. 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m112.348946.

CHEN, J. et al. Zika virus infects renal proximal tubular epithelial cells with prolonged persistency and cytopathic effects. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-7, jan. 2017. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1038/emi.2017.67.

CHRISTMANN, B. et al. Ccr5 Regulates Inflammatory Gene Expression in Response to Encephalomyocarditis Virus Infection. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 179, n. 6, p. 2941-2951, dez. 2011. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.08.012.

CHUONG, C. *et al.* Nutritional status impacts dengue virus infection in mice. **Bmc Biology**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-14, 27 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s12915-020-00828-x.

COLOMBO, T. *et al.* Clinical, laboratory and virological data from suspected ZIKV patients in an endemic arbovirus area. **Journal Of Clinical Virology**, [S.L.], v. 96, p. 20-25, nov. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2017.09.002.

COSTA, D. et al. Contribution of RAS, ROS and COX-1-derived prostanoids to the contractile profile of perivascular adipose tissue in cafeteria diet-induced obesity. **Life Sciences**, [S.L.], v. 309, p. 120994, nov. 2022. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120994.

COSTA, R. et al. Role Of The C-C Motif Chemokine Ligand 5 (CCL5) And Its Receptor, C-C Motif Chemokine Receptor 5 (CCR5) In The Genesis Of Aldosterone-induced Hypertension, Vascular Dysfunction, And End-organ Damage. ***bioRxiv*** *(Cold Spring Harbor Laboratory)*. 2023. [online]. https://doi.org/10.1101/2023.09.22.558020.

COSTA, R. et al. Role of the CCL5 and Its Receptor, CCR5, in the Genesis of Aldosterone-Induced Hypertension, Vascular Dysfunction, and End-Organ Damage. **Hypertension**, [S.L.], v. 81, n. 4, p. 776-786, abr. 2024. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.123.21888.

COSTA, V. et al. A Model of DENV-3 Infection That Recapitulates Severe Disease and Highlights the Importance of IFN-γ in Host Resistance to Infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 1-15, 29 maio 2012. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001663.

COSTA, V. *et al.* N -Methyl- d -Aspartate (NMDA) Receptor Blockade Prevents Neuronal Death Induced by Zika Virus Infection. **Mbio**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 1-16, 3 maio 2017. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00350-17.

COSTA, V. Targeting the Annexin A1-FPR2/ALX pathway for host-directed therapy in dengue disease. **Elife**, [S.L.], v. 11, p. 1-24, 16 mar. 2022. ELife Sciences Publications, Ltd. http://dx.doi.org/10.7554/elife.73853.

DE ARAÚJO, T. et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. **The Lancet Infectious**

Diseases, [online] 18(3), pp.328–336. 2018. doi:https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30727-2.

DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Boletim Epidemiológico n° 22/2019 Vigilância entomológica do Aedes aegypti e situação epidemiológica de dengue, febre de chikungunya e zika vírus em Santa Catarina (Atualizado em 10/08/2019 – SE 32/2019)**. 2019. Disponível em: <https://www.dive.sc.gov.br/index.php/arquivo-noticias/927-boletim-epidemiologico-n-22-2019-vigilancia-entomologica-do-aedes-aegypti-e-situacao-epidemiologica-de-dengue-febre-de-chikungunya-e-zika-virus-em-santa-catarina-atualizado-em-10-08-2019-se-32-2019>. Acesso em: 29 ago. 2020.

DU, X. et al. Tumor necrosis factor-α promotes lipolysis and reduces insulin sensitivity by activating nuclear factor kappa B and c-Jun N-terminal kinase in primary bovine adipocytes. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 10, p. 8426–8438, out. 2022.

FARIAS R. et al. Inhibition of SGLT2 co-transporter by dapagliflozin ameliorates tubular proteinuria and tubule-interstitial injury at the early stage of diabetic kidney disease. **Eur J Pharmacol.** 2023 Mar 5;942:175521. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175521. Epub 2023 Jan 19. PMID: 36681317.

FETALVERO, K. et al. The prostacyclin receptor induces human vascular smooth muscle cell differentiation via the protein kinase A pathway. **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**, [S.L.], v. 290, n. 4, p. 1337-1346, abr. 2006. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00936.2005.

FIOCRUZ. **Saúde divulga primeiro balanço com casos de Zika no país**. 2016. Disponível em: <https://rededengue.fiocruz.br/numeros/404-saude-divulga-primeiro-balanco-com-casos-de-zika-no-pais>. Acesso em: 28 ago. 2020.

FU, J. et al. PDE4D inhibition ameliorates cardiac hypertrophy and heart failure by activating mitophagy. **Redox Biology**, [S.L.], v. 81, p. 103563, abr. 2025. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2025.103563.

GAVINO-LEOPOLDINO, D. et al. Skeletal Muscle Is an Early Site of Zika Virus Replication and Injury, Which Impairs Myogenesis. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 95,

n. 22, p. 1-15, 27 out. 2021. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00904-21.

GIRDHAR, R. et al. Cardiac Manifestation involvement in Dengue Infection. **Journal Of Medical Science And Clinical Research**, [S.L.], v. 5, n. 11, p. 30413-30420, 15 nov. 2017. Valley International. http://dx.doi.org/10.18535/jmscr/v5i11.102.

GULLAND, A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. **Bmj**, [S.L.], p. 657-657, 2 fev. 2016.

GUO, R. *et al.* Prevalence and Utility of Low Mean Corpuscular Volume in Infants Admitted to the Neonatal Intensive Care Unit. **The Journal Of Pediatrics**, [S.L.], v. 227, p. 1-8, dez. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2020.07.056.

HAJJAR, R. et al. Adenoviral Gene Transfer of Phospholamban in Isolated Rat Cardiomyocytes. **Circulation Research**, [S.L.], v. 81, n. 2, p. 145-153, ago. 1997. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1161/01.res.81.2.145.

HART, B.L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [online] 12(2), pp.123–137. 1988. https://doi.org/10.1016/s0149-7634(88)80004-6.

HE, Z. et al. NLRP3 Inflammasome Activation Mediates Zika Virus–Associated Inflammation. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 217, n. 12, p. 1942-1951, 6 mar. 2018. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiy129.

HEESEN, B.; HOTCHKISS, R.; KARL, I. Sepsis decreases phenylephrine− and KCl-induced aortic ring contraction and decreases the frequency of oscillations in active wall tension. **Shock**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 106-112, ago. 1994. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/00024382-199408000-00005.

HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: an update. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 190, p. 99-111, fev. 2019.

HITOSHI et al. CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [online] 98, pp.62–72. 2016. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.06.007.

HUANG, H. et al. CCR5 regulates Aβ1-42-induced learning and memory deficits in mice. **Neurobiology Of Learning And Memory**, [S.L.], v. 208, p. 107890, fev. 2024. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2024.107890.

HUANG, X. et al. SARS-CoV-2 induces cardiomyocyte apoptosis and inflammation but can be ameliorated by ACE inhibitor Captopril. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 215, p. 105636, jul. 2023. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105636.

HUSSAIN, A. et al. A Comprehensive Review of the Manifestations and Pathogenesis of Zika Virus in Neonates and Adults. **Cureus**, [S.L.], p. 1-10, 12 set. 2018.

JAN, I. et al. Hypoglycemia associated with bacteremic pneumococcal infections. **International Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 570-576, set. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2008.08.026.

JASCHONEK, K. et al. Desensitization of platelets to iloprost. Loss of specific binding sites and heterologous desensitization of adenylate cyclase. **European Journal of Pharmacology**, [online] 147(2), pp.187–196. 1988. https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90777-7.

JONES, A. *et al.* Diagnostic Accuracy Of Left Ventricular Function For Identifying Sepsis Among Emergency Department Patients With Nontraumatic Symptomatic Undifferentiated Hypotension. **Shock**, [S.L.], v. 24, n. 6, p. 513-517, dez. 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/01.shk.0000186931.02852.5f.

KABRA S. et al. Myocardial dysfunction in children with dengue haemorrhagic fever. **The National medical journal of India**, [online] 11(2). 1998; Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9624863/.

KANDASAMY, K. *et al.* Atorvastatin Prevents Vascular Hyporeactivity to Norepinephrine in Sepsis. **Shock**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 76-82, jul. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/shk.0b013e31821a4002.

KANGUSSU, L. *et al.* Dengue virus infection induces inflammation and oxidative stress on the heart. **Heart**, [S.L.], v. 108, n. 5, p. 388-396, 28 maio 2021. BMJ. http://dx.doi.org/10.1136/heartjnl-2020-318912.

KELLY, K. et al. CCR5 Inhibition Prevents Cardiac Dysfunction in the SIV/Macaque Model of HIV. **Journal Of The American Heart Association**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 1-1, 24 mar. 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1161/jaha.114.000874.

KÖRTVELYESSY, P. et al. Serum neurofilament light chain in COVID-19 and the influence of renal function. **European Journal Of Medical Research**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 112-117, 28 set. 2023. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s40001-023-01375-1.

KOSTYUCHENKO, V. et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**, [S.L.], v. 533, n. 7603, p. 425-428, 19 abr. 2016. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nature17994.

JOVIANO-SANTOS, J. et al. New insights into the elucidation of angiotensin-(1–7) in vivo antiarrhythmic effects and its related cellular mechanisms. **Experimental Physiology**, [S.L.], v. 101, n. 12, p. 1506-1516, 16 nov. 2016. Wiley. http://dx.doi.org/10.1113/ep085884.

KOTEPUI, M. *et al.* Differentiating between dengue fever and malaria using hematological parameters in endemic areas of Thailand. **Infectious Diseases Of Poverty**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-9, 2 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s40249-017-0238-x.

KRITTANAWONG, C.; ZHANG, H.; SUN, T. Cardiovascular complications after Zika virus infection. **International Journal Of Cardiology**, [S.L.], v. 221, p. 859-859, out. 2016.

KRITTANAWONG, Chayakrit. Useful strategies for the emerging of Zika pandemic and its silent cardiovascular complications. **European Journal Of Preventive Cardiology**, [S.L.], v. 24, n. 18, p. 1988-1990, 20 out. 2017.

KUKOVETZ, W. R.; HOLZMANN, S.; WURM, A.; PÖCH, G. Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. **Journal of Cyclic Nucleotide Research**, v. 5, n. 6, p. 469-476, dez. 1979. PMID: 231612.

KULARATNE, S. *et al.* Cardiac complications of a dengue fever outbreak in Sri Lanka, 2005. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**,

[S.L.], v. 101, n. 8, p. 804-808, ago. 2007. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.02.021.

KULARATNE, S. *et al.* Heart and liver are infected in fatal cases of dengue: three pcr based case studies. **Bmc Infectious Diseases**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-6, dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s12879-018-3603-x.

KUMARSWAMY, R. *et al.* SERCA2a gene therapy restores microRNA-1 expression in heart failure via an Akt/FoxO3A-dependent pathway. **European Heart Journal**, [S.L.], v. 33, n. 9, p. 1067-1075, 23 fev. 2012. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehs043.

LANCIOTTI, R. et al. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 22, n. 5, p. 933-935, maio 2016.

LANDGRAF S. et al. 5-Lypoxygenase products are involved in renal tubulointerstitial injury induced by albumin overload in proximal tubules in mice. **PLoS One**. 2014 Oct 10;9(10): e107549. doi: 10.1371/journal.pone.0107549. PMID: 25302946; PMCID: PMC4193734.

LA-ORKHUN, V *et al.* Spectrum of cardiac rhythm abnormalities and heart rate variability during the convalescent stage of dengue virus infection: a holter study. **Annals Of Tropical Paediatrics**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 123-128, maio 2011. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1179/1465328111y.0000000008.

LEDA, A. et al. Selective Disruption of the Blood–Brain Barrier by Zika Virus. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-14, 18 set. 2019. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02158.

LEE, V. *et al*. Simple Clinical and Laboratory Predictors of Chikungunya versus Dengue Infections in Adults. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 1786, 27 set. 2012. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001786.

LI, L. et al. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in β-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. **American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology**, [S.L.], v. 278, n. 3, p. 769-779, 1 mar. 2000. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.2000.278.3.h769.

LI, S. *et al.* Zika Virus Infection Downregulates Connexin 43, Disrupts the Cardiomyocyte Gap Junctions and Induces Heart Diseases in A129 Mice. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 96, n. 21, p. 1-18, 9 nov. 2022. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01373-22.

LI, X. et al. Characterization of a 2016 Clinical Isolate of Zika Virus in Non-human Primates. **Ebiomedicine**, [S.L.], v. 12, p. 170-177, out. 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.022.

LI, Y. et al. Characterization of the Myocarditis during the worst outbreak of dengue infection in China. ***Medicine*****,** [online] 95(27), pp.e4051–e4051. 2016. https://doi.org/10.1097/md.0000000000004051.

LIEN, T. *et al.* Exposure of Platelets to Dengue Virus and Envelope Protein Domain III Induces Nlrp3 Inflammasome-Dependent Platelet Cell Death and Thrombocytopenia in Mice. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, p. 1-13, 29 abr. 2021. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.616394.

LIN, R. et al. Essential Role of Interferon Regulatory Factor 3 in Direct Activation of RANTES Chemokine Transcription. **Molecular And Cellular Biology**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 959-966, 1 fev. 1999. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1128/mcb.19.2.959.

LIN, W. *et al.* Development of NS2B-NS3 protease inhibitor that impairs Zika virus replication. **Virus Research**, [S.L.], v. 329, p. 1-9, maio 2023. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199092.

LINDENBACH, B; THIEL H. Flavivirus: The virus and their replication. In: **Fields Virology**. [s.l: s.n.]. 2007.

LIU, T. et al. Zika Virus Infection Induces Acute Kidney Injury Through Activating NLRP3 Inflammasome Via Suppressing Bcl-2. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, p. 1-17, 14 ago. 2019. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01925.

LIU, Y. et al. Physiological and pathological roles of protein kinase A in the heart. **Cardiovascular Research**, [S.L.], v. 118, n. 2, p. 386-398, 23 jan. 2021. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvab008.

LO, N. et al. Molecular Determinants of Tissue Specificity of Flavivirus Nonstructural Protein 1 Interaction with Endothelial Cells. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 96, n. 19, p. 1-16, 12 out. 2022. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00661-22.

LOPALCO, L. et al. CCR5-Reactive Antibodies in Seronegative Partners of HIV-Seropositive Individuals Down-Modulate Surface CCR5 In Vivo and Neutralize the Infectivity of R5 Strains of HIV-1 In Vitro. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 164, n. 6, p. 3426-3433, 15 mar. 2000. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.164.6.3426.

LOU, Q.; JANARDHAN, A.; EFIMOV, I. Remodeling of Calcium Handling in Human Heart Failure. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [S.L.], p. 1145-1174, 2012. Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_52.

LU, D. et al. Temporal variations in QTc interval during and after COVID-19 infection: a retrospective study. **Bmc Cardiovascular Disorders**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 1-8, 23 dez. 2024. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s12872-024-04405-w.

LYON, A. *et al.* SERCA2a Gene Transfer Decreases Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak and Reduces Ventricular Arrhythmias in a Model of Chronic Heart Failure. **Circulation**: Arrhythmia and Electrophysiology, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 362-372, jun. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1161/circep.110.961615.

MACHADO, F. et al. CCR5 Plays a Critical Role in the Development of Myocarditis and Host Protection in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. ***The Journal of Infectious Diseases***, [online] 191(4), pp.627–636. 2005. https://doi.org/10.1086/427515.

MAJMUDAR, M. et al. Monocyte-Directed RNAi Targeting CCR2 Improves Infarct Healing in Atherosclerosis-Prone Mice. **Circulation**, [S.L.], v. 127, n. 20, p. 2038-2046, 21 maio 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.112.000116.

MARQUES, R. et al. Dengue virus requires the CC-chemokine receptor CCR5 for replication and infection development. **Immunology**, [S.L.], v. 145, n. 4, p. 583-596, jun. 2015. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/imm.12476.

MARSTON, Steven. Recent studies of the molecular mechanism of lusitropy due to phosphorylation of cardiac troponin I by protein kinase A. **Journal Of Muscle Research And Cell Motility**, [S.L.], v. 44, n. 3, p. 201-208, 21 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s10974-022-09630-4.

MARTIN, B. et al. Sex and molecular differences in cardiovascular parameters at peak influenza disease in mice. **Physiological Genomics**, [S.L.], v. 55, n. 2, p. 79-89, 1 fev. 2023. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00146.2022.

MARTINES, R. et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *The Lancet*, [online] 388(10047), pp.898–904. 2016. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30883-2.

MATTIAZZI, Alicia; KRANIAS, Evangelia G.. The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 5, p. 1-11, 2014. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2014.00005.

MATURU, P. et al. Role of Cyclooxygenase-2 Pathway in Creating an Immunosuppressive Microenvironment and in Initiation and Progression of Wilms' Tumor. **Neoplasia**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 237-249, mar. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2016.07.009.

MCCARTHY, M.; WEINBERG, J. Eicosanoids and Respiratory Viral Infection: coordinators of inflammation and potential therapeutic targets. **Mediators Of Inflammation**, [S.L.], v. 2012, p. 1-13, 2012. Wiley. http://dx.doi.org/10.1155/2012/236345.

MEDDINGS, J. B.; SCOTT, R. B.; FICK, G. H. Analysis and comparison of sigmoidal curves: application to dose-response data.: application to dose-response data. **American Journal Of Physiology-gastrointestinal And Liver Physiology**, [s.l.], v. 257, n. 6, p. 982-989, dec. 1989.

MINHAS, A. *et al.* Association of Zika Virus with Myocarditis, Heart Failure, and Arrhythmias: a literature review. **Cureus**, [S.L.], p. 1-6, 27 jun. 2017. Cureus, Inc.. http://dx.doi.org/10.7759/cureus.1399.

MIRANDA-FILHO, D. et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. **American Journal Of Public Health**, [S.L.], v. 106, n. 4, p. 598-600, abr. 2016. American Public Health Association. http://dx.doi.org/10.2105/ajph.2016.303115.

MITCHELL, J.; KIRKBY, N. Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 176, n. 8, p. 1038-1050, 14 abr. 2018. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/bph.14167.

MLADINICH, M. et al. Blockade of Autocrine CCL5 Responses Inhibits Zika Virus Persistence and Spread in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. **Mbio**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 1-16, 31 ago. 2021. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/mbio.01962-21.

MLERA, L.; MELIK, W; BLOOM, M. The role of viral persistence in flavivirus biology. **Pathogens And Disease**, [S.L.], v. 71, n. 2, p. 137-163, 12 maio 2014. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1111/2049-632x.12178.

MUKHOPADHYAY, Suchetana; KIM, Bong-Suk; CHIPMAN, Paul R.; ROSSMANN, Michael G.; KUHN, Richard J.. Structure of West Nile Virus. **Science**, [S.L.], v. 302, n. 5643, p. 248-248, 10 out. 2003. American Association for the Advancement of Science (AAAS). http://dx.doi.org/10.1126/science.1089316.

MÜLLER, U. et al. Functional Role of Type I and Type II Interferons in Antiviral Defense. **Science**, [S.L.], v. 264, n. 5167, p. 1918-1921, 24 jun. 1994. American Association for the Advancement of Science (AAAS). http://dx.doi.org/10.1126/science.8009221.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.

MYERSON, M. et al. Prolonged QTc in HIV-Infected Patients: a need for routine ecg screening. **Journal Of The International Association Of Providers Of Aids Care (Jiapac)**, [S.L.], v. 18, p. 1-8, 1 jan. 2019. SAGE Publications. http://dx.doi.org/10.1177/2325958219833926.

NGUYEN, S. et al. Highly efficient maternal-fetal Zika virus transmission in pregnant rhesus macaques. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 1006378, 25 maio 2017. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006378.

NYSTORIAK, M. et al. Ser ^{1928} phosphorylation by PKA stimulates the L-type Ca^{2+} channel $Ca_V1.2$ and vasoconstriction during acute hyperglycemia and diabetes. ***Science Signaling***, [online] 10(463). 2017. doi:https: //doi.org/10.1126/scisignal.aaf9647.

OBEYESEKERE, I.; HERMON, Y. Myocarditis and cardiomyopathy after arbovirus infections (dengue and chikungunya fever). **Heart**, v. 34, n. 8, p. 821–827, 1 ago. 1972.

OLEJNICKOVA, V.; NOVAKOVA, M.; PROVAZNIK, I. Isolated heart models: cardiovascular system studies and technological advances. **Med Biol Eng Comput**, 53, n. 7, p. 669-678, Jul 2015.

OLIVERA MITROVIĆ-AJTIĆ et al. Sex Differences and Cytokine Profiles among Patients Hospitalized for COVID-19 and during Their Recovery: The Predominance of Adhesion Molecules in Females and Oxidative Stress in Males. **Vaccines**, [online] 11(10), pp.1560–1560. 2023. https://doi.org/10.3390/vaccines11101560.

OLIVEIRA-NETO, J. et al. Acute Chikungunya Infection Induces Vascular Dysfunction by Directly Disrupting Redox Signaling in Endothelial Cells. **Cells**, [S.L.], v. 13, n. 21, p. 1-18, 25 out. 2024. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/cells13211770.

NAÇÕES UNIDAS (ONU). Novas epidemias de zika 'continuam sendo prováveis' nas Américas, diz ONU. 2017. Disponível em: https://brasil.un.org/pt-br/76914-novas-epidemias-de-zika-continuam-sendo-prov%C3%A1veis-nas-am%C3%A9ricas-diz-onu. Acesso em: 20 set. 2020.

OZER, E. *et al.* Celecoxib administration reduced mortality, mesenteric hypoperfusion, aortic dysfunction and multiple organ injury in septic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 86, p. 583-589, fev. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.102.

PAONESSA, J. *et al.* Hyperdynamic left ventricular ejection fraction in the intensive care unit. **Critical Care**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 1-7, dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1186/s13054-015-1012-8.

PAPA, M. et al. Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, p. 1-17, 22 dez. 2017. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02557.

PARK, D. et al. Frequency, causes, predictors, and clinical significance of peri-procedural myocardial infarction following percutaneous coronary intervention. **European Heart Journal**, [S.L.], v. 34, n. 22, p. 1662-1669, 12 fev. 2013. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/eht048.

PERNOMIAN, L. *et al.* C-Type Natriuretic Peptide Induces Anti-contractile Effect Dependent on Nitric Oxide, Oxidative Stress, and NPR-B Activation in Sepsis. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 7, p. 1-13, 23 jun. 2016. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2016.00226.

PERUCHETTI, D. et al. Megalin-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubules is involved in the antiproteinuric effect of angiotensin II type 1 receptor blocker in a subclinical acute kidney injury animal model. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1865, n. 9, p. 129950, 2021. doi: 10.1016/j.bbagen.2021.129950.

Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. **Uma Avaliação do Impacto Socioeconômico do Vírus Zika na América Latina e Caribe: Brasil, Colômbia e Suriname como estudos de caso.** Abril 2017. Disponível em: <https://www.br.undp.org/content/brazil/pt/home/library/ods/a-socio-economic-impact-assessment-of-the-zika-virus-in-latin-am.html>. Acesso em: 28 ago. 2020.

PUERTA-GUARDO, H. et al. Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. **Cell Reports**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 1598-1613, fev. 2019. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.036.

QADIR, A. et al. Potential targets for therapeutic intervention and structure based vaccine design against Zika virus. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 156, p. 444-460, ago. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.014.

QIAN, J. et al. Isoproterenol induces MD2 activation by β-AR-cAMP-PKA-ROS signalling axis in cardiomyocytes and macrophages drives inflammatory heart

failure. ***Acta Pharmacologica Sinica***, [online] 45(3), pp.531–544. 2023. doi:https://doi.org/10.1038/s41401-023-01179-3.

QIN, J. et al. Structures of PKA–phospholamban complexes reveal a mechanism of familial dilated cardiomyopathy. **Elife**, [S.L.], v. 11, p. 1-21, 17 mar. 2022. ELife Sciences Publications, Ltd. http://dx.doi.org/10.7554/elife.75346.

QIN, Z. Zika virus infection triggers lipophagy by stimulating the AMPK-ULK1 signaling in human hepatoma cells. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 12, p. 1-14, 2 nov. 2022. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2022.959029.

QIU, L. et al. Secondary cross infection with dengue virus serotype 2/3 aggravates vascular leakage in BALB/c mice. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 94, n. 9, p. 4338-4347, 14 maio 2022. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/jmv.27826.

RATTANASOPA, C. et al. Significant role of estrogen in maintaining cardiac mitochondrial functions. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 147, p. 1-9, mar. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.009.

RATTARASARN C. Hypoglycemia in sepsis: risk factors and clinical characteristics. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*, [online] 80(12). 1997. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9470328/ [Accessed 29 Apr. 2025].

RAVINDRAN, D. et al. Chemokine binding protein ‘M3’ limits atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. ***PLoS ONE***, 12(3), pp.e0173224–e0173224. 2017. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173224.

REN, Z. *et al.* A survey of clinical and laboratory characteristics of the dengue fever epidemic from 2017 to 2019 in Zhejiang, China. **Medicine**, [S.L.], v. 101, n. 42, p. 1-9, 21 out. 2022. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/md.0000000000031143.

RESIERE, D. et al. Cardiovascular complications in patients with Zika virus-induced Guillain-Barré syndrome. **Journal Of Clinical Virology**, [S.L.], v. 98, p. 8-9, jan. 2018.

RIBEIRO, N. et al. PVAT-induced aortic hypercontractility in acute sepsis: role of ROS and COX-2 signaling. **Life Sciences**, [S.L.], v. 375, p. 1-12, ago. 2025. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2025.123745.

ROSSI, S. Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 94, n. 6, p. 1362-1369, 1 jun. 2016. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.16-0111.

SCHRÖER, J.; SHENK, T. Inhibition of cyclooxygenase activity blocks cell-to-cell spread of human cytomegalovirus. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 105, n. 49, p. 19468-19473, 9 dez. 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0810740105.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2020. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 29, 2020**. Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/06/Boletim-epidemiologico-SVS-31.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2020.

SHAHEEN, Z. et al. CCR5 is a required signaling receptor for macrophage expression of inflammatory genes in response to viral double-stranded RNA. **American Journal Of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [S.L.], v. 316, n. 5, p. 525-534, 1 maio 2019. American Physiological Society. http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00019.2019.

SHARMA, A. et al. Human iPSC-Derived Cardiomyocytes Are Susceptible to SARS-CoV-2 Infection. **Cell Reports Medicine**, [S.L.], v. 1, n. 4, p. 1-13, jul. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100052.

SHIOYA, Takao. A Simple Technique for Isolating Healthy Heart Cells from Mouse Models. **The Journal Of Physiological Sciences**, [S.L.], v. 57, n. 6, p. 327-335, 2007. Physiological Society of Japan. http://dx.doi.org/10.2170/physiolsci.rp010107.

SIKAROUDI, M. et al. Assessment of anorexia and weight loss during the infection and recovery period of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19**). *Clinical***

Nutrition Open Science, [online] 40, pp.102–110. 2021. https://doi.org/10.1016/j.nutos.2021.11.001.

SILVA, A e; SPALDING, S. Zika virus - Epidemiology and laboratory diagnosis. **Revista Médica de Minas Gerais**, [S.L.], v. 28, p. 1-5, 2018.

SILVA, M. et al. Chikungunya and Mayaro Viruses Induce Chronic Skeletal Muscle Atrophy Triggered by Pro-Inflammatory and Oxidative Response. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 25, n. 16, p. 8909, 16 ago. 2024. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/ijms25168909.

SINGH, A. *et al.* Clinico-haematological profile of patients with bicytopenia. **Pathology**, [S.L.], v. 50, n. 5, p. 540-548, ago. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.pathol.2018.03.008.

SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, [S.L.], v. 352, n. 6284, p. 467-470, 22 abr. 2016. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf5316.

SONG, B. *et al.* Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal Of Neuroimmunology**, [S.L.], v. 308, p. 50-64, jul. 2017.

STARK, J. Interpretation of BUN and serum creatinine. An interactive exercise. ***Critical care nursing clinics of North America*****,** [online] 10(4). 1998. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10326428/.

STEINBACH R. et al. A neonatal nonhuman primate model of gestational Zika virus infection with evidence of microencephaly, seizures and cardiomyopathy. **Plos One**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-32, 14 jan. 2020.

STEINKE, K. et al. Coxsackievirus B3 modulates cardiac ion channels. **The Faseb Journal**, [S.L.], v. 27, n. 10, p. 4108-4121, 27 jun. 2013. Wiley. http://dx.doi.org/10.1096/fj.13-230193.

STITHAM, J., et al. Clusters of Transmembrane Residues Are Critical for Human Prostacyclin Receptor Activation. **Biochemistry**, [online] 43(28), pp.8974–8986. 2004. https://doi.org/10.1021/bi0496788.

SUAREZ-CARMONA, M. et al. CCR5 status and metastatic progression in colorectal cancer. **Oncoimmunology**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 1626193, 13 jul. 2019. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/2162402x.2019.1626193.

TAI, W., et al. Transfusion-Transmitted Zika Virus Infection in Pregnant Mice Leads to Broad Tissue Tropism With Severe Placental Damage and Fetal Demise. **Frontiers in Microbiology**, [online] 10. 2019. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00029.

TSENG, Z. et al. Sudden Cardiac Death in Patients With Human Immunodeficiency Virus Infection. **Journal Of The American College Of Cardiology**, [S.L.], v. 59, n. 21, p. 1891-1896, maio 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2012.02.024.

TUCCI, M. et al. Deregulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in arterial hypertension: role in endothelial inflammation and atheromasia. **Journal Of Hypertension**, [S.L.], v. 24, n. 7, p. 1307-1318, jul. 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/01.hjh.0000234111.31239.c3.

ULLRICH, Nina D.; VALDIVIA, Héctor H.; NIGGLI, Ernst. PKA phosphorylation of cardiac ryanodine receptor modulates SR luminal Ca2+ sensitivity. **Journal Of Molecular And Cellular Cardiology**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 33-42, jul. 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.03.015.

VALENTINE, G. et al. Timing of gestational exposure to Zika virus is associated with postnatal growth restriction in a murine model. **American Journal Of Obstetrics And Gynecology**, [S.L.], v. 219, n. 4, p. 403-403, out. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2018.06.005.

VELLERE, Iacopo *et al.* Arbo-Score: a rapid score for early identification of patients with imported arbovirosis caused by dengue, chikungunya and zika virus. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 11, p. 1731, 4 nov. 2020. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8111731.

VICTORA, C. G. et al. Low body weight: a simple indicator of the risk of dehydration among children with diarrhoea. **Journal of diarrhoeal diseases research**, v. 15, n. 1, p. 7–11, mar. 1997.

VILLAMIL-GÓMEZ, W. et al. Cardiac Compromise in Zika Virus Infection. **Mayo Clinic Proceedings**, [S.L.], v. 93, n. 3, p. 393-394, mar. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.12.006.

WAGGONER, J. et al. Pericarditis Associated With Acute Zika Virus Infection in a Returning Traveler. **Open Forum Infectious Diseases**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 1-4, 2017.

WALI, J. *et al.* Cardiac involvement in Dengue Haemorrhagic Fever. **International Journal Of Cardiology**, [S.L.], v. 64, n. 1, p. 31-36, mar. 1998. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/s0167-5273(98)00008-4.

WANG, J.; HU, Z.; CHEN, J. Characteristics of abnormal serum creatine kinase-MB levels in children with COVID-19. **World Journal Of Pediatrics**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 326-328, 19 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s12519-020-00402-z.

WANG, T. et al. Estrogen-Related Receptor α (ERRα) and ERRγ Are Essential Coordinators of Cardiac Metabolism and Function. **Molecular And Cellular Biology**, [S.L.], v. 35, n. 7, p. 1281-1298, 1 abr. 2015. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1128/mcb.01156-14.

WANG, Y. et al. β1-adrenoceptor stimulation promotes LPS-induced cardiomyocyte apoptosis through activating PKA and enhancing CaMKII and IκBα phosphorylation. **Critical Care**, [online] 19(1). 2015. https://doi.org/10.1186/s13054-015-0820-1.

WEINBREN, M.P; WILLIAMS, M.C. Zika virus: further isolations in the zika area, and some studies on the strains isolated. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 52, n. 3, p. 263-268, maio 1958. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(58)90085-3.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) . **2016. Public Health Emergency of International Concern**. 2016. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/zika-virus-tmp/en/>. Acesso em: 27 ago. 2020.

XUE, C. et al. Integrative analysis reveals chemokines CCL2 and CXCL5 mediated shear stress-induced aortic dissection formation. **Heliyon**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 23312, jan. 2024. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23312.

YADAV, P. *et al.* 2-Benzyllawsone protects against polymicrobial sepsis and vascular hyporeactivity in swiss albino mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 917, p. 174757, 15 fev. 2022.

YAN, J. et al. CCR5 Activation Promotes NLRP1-Dependent Neuronal Pyroptosis via CCR5/PKA/CREB Pathway After Intracerebral Hemorrhage. **Stroke**, [S.L.], v. 52, n. 12, p. 4021-4032, dez. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1161/strokeaha.120.033285.

YEUNG, W. *et al.* Blood pressure trend in hospitalized adult dengue patients. **Plos One**, [S.L.], v. 15, n. 7, p. 1-11, 1 jul. 2020. Public Library of Science (PLoS). http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0235166.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 110, n. 4, p. 569-572, 9 jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150192.

ZANNIDI, D. et al. Factors Associated with Significant Weight Loss in Hospitalised Patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a large teaching hospital. **Nutrients**, [S.L.], v. 14, n. 19, p. 4195, 8 out. 2022. MDPI AG. http://dx.doi.org/10.3390/nu14194195.

ZHANG, L. *et al.* Infectivity of Zika virus on primary cells support tree shrew as animal model. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 232-241, 1 jan. 2019. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2018.1559707.

ZHANG, X. et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. **Nature Structural & Molecular Biology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 105-110, 16 dez. 2012. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2463.

ZHAO, H. *et al.* Role of Tumor Necrosis Factor-α in vascular hyporeactivity following endotoxic shock and its mechanism. **Journal Of Trauma And Acute Care Surgery**, [S.L.], v. 87, n. 6, p. 1346-1353, 29 ago. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). http://dx.doi.org/10.1097/ta.0000000000002490.

ZHOU, Q. et al. CCR5 blockade inflames antitumor immunity in BAP1-mutant clear cell renal cell carcinoma. **Journal For Immunotherapy Of Cancer**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 000228, abr. 2020. BMJ. http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2019-000228.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. The Chemokine Superfamily Revisited. **Immunity**, [S.L.], v. 36, n. 5, p. 705-716, maio 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.008.

10. Agradecimento às agências de fomento

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Farmacologia Vascular (LFV) do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com suporte financeiro da

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).