

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Vidyleison Neves Camargos

**A INFECÇÃO PRÉ-NATAL PELO ZIKA VIRUS EM CAMUNDONGOS
IMUNOCOMPETENTES É ASSOCIADA COM ANORMALIDADES DA PROLE
ADULTA**

Belo Horizonte

2020

Vidyleison Neves Camargos

**A INFECÇÃO PRÉ-NATAL PELO ZIKA VIRUS EM CAMUNDONGOS
IMUNOCOMPETENTES É ASSOCIADA COM ANORMALIDADES DA PROLE
ADULTA**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências: Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza

Co-orientadora: Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski

Belo Horizonte

2020

043

Camargos, Vidyleison Neves.

A infecção pré-natal pelo Zika virus em camundongos imunocompetentes é associada com anormalidades da prole adulta [manuscrito] / Vidyleison Neves Camargos. – 2020.

178 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza. Co-orientadora: Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Infecção por Zika virus. I. Souza, Danielle da Glória de. II. Litwinski, Vivian Vasconcelos Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE Vidyleison Neves Camargos
Nº REGISTRO: 2016711323

Às 9 horas do dia 16 de junho de 2020, reuniu-se, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Caio Tavares Fagundes, Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Jean Pierre Schatzmann Peron, Rafael Elias Marques Pereira Silva e a Profa. Danielle da Glória de Souza – Orientadora, para julgar o trabalho final A Infecção Pré-natal Pelo Zika Virus Em Camundongos Imunocompetentes É Associada Com Anormalidades Da Prole Adulta, do aluno **Vidyleison Neves Camargos**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO** O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de junho de 2020. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

Profa. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis

Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

Prof. Dr. Rafael Elias Marques Pereira Silva

Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza (Orientadora)

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

Dedico esse trabalho a todos os mentores que tive ao longo da vida acadêmica. Vocês contribuíram imensamente para o desenvolvimento do ser que sou hoje, no trabalho e fora dele. Deixo aqui meu mais sincero muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Danielle e Vivian, por proporcionar a grande oportunidade de desenvolver esse trabalho sob suas orientações e também pelo apoio, sabedoria, conhecimento, ensinamentos, paciência e magnífica orientação durante todo o tempo. De coração, muito obrigado!

Aos membros das bancas de defesa de projeto, qualificação e tese, Dr. Antônio Oliveira, Dr. Alexandre Machado, Dra. Vanessa Silva, Dr. Caio Fagundes, Dra. Jordana Reis, Dr. Rafael Silva, Dr. Jean Peron e Dra. Jaqueline Ferreira. Por aceitarem os convites de participação nas bancas em meio a tantos outros afazeres e, principalmente, pelas ótimas contribuições dadas que tanto melhoraram nosso trabalho.

Ao grupo de Imunofarmacologia e especialmente ao Prof. Mauro Martins Teixeira, que contribuiu em todos os sentidos desse trabalho, desde a concepção do projeto à publicação do artigo científico. Aos demais membros do grupo que também contribuíram de alguma forma, desde a discussão de resultados a encontrar algum reagente no laboratório num momento de urgência. Também agradeço imensamente a todos os pesquisadores colaboradores desse projeto.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia pela sua excelência no ensino e reflexão em suas disciplinas.

Aos técnicos administrativos do ICB que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho. Principalmente à Frank e Gil por serem tão prestativas e auxiliar de várias formas a todos no laboratório.

À CAPES, CNPq, FAPEMIG e demais órgãos de fomento pelo auxílio financeiro. À UFMG e, principalmente, ao ICB e seus pesquisadores por proporcionar grande parte da infraestrutura usada para a realização deste trabalho. Agradeço também FAPESP e seus pesquisadores por terem me proporcionado a oportunidade de participar da “Escola São Paulo de Ciência Avançada” em duas edições diferentes.

Aos amigos de laboratório Thaianne, Micheli, Ian, Camila, Brenda, Jordane, Carla, Rafaela, Gabriela e todos os outros membros do Laboratório de Interação Microorganismo Hospedeiro pela grande amizade, companheirismo, pelo auxílio nos experimentos desde o primeiro dia na UFMG e pelas discussões dentro e fora do laboratório.

À minha família, à Maria José, minha querida mãe, minha irmã Vanessa e meus irmãos Veidson e Verlison, pela compreensão, incentivo e apoio constante durante todos esses anos.

À minha segunda família, Natalia, minha grande companheira amada, pelo apoio, carinho, sabedoria e conhecimento nas discussões científicas e da vida. Júlio e Branca, por me acolherem em sua querida família de braços abertos. À toda a família, muito obrigado!

Por fim, gostaria de agradecer especialmente a todos os cientistas, profissionais da saúde e de linha de frente de todo o mundo que trabalham incansavelmente, muitas vezes arriscando suas vidas, para combater a pandemia que vivemos nesse ano de 2020. Que a ciência, sabedoria e humildade guiem os líderes mundiais e locais, responsáveis pela vida de tantas pessoas.

*“Yes, there are two paths you can go by
But in the long run
There's still time to change the road you're on”
Jimmy Page e Robert Plant – Led Zeppelin*

Resumo

A infecção pelo Zika vírus (ZIKV) durante a gestação está associada com graves alterações congênitas, incluindo microcefalia, anormalidades sensoriais, articulares e musculares, entre outras, as quais são definidas como Síndrome Congênita pelo Zika. Ainda, diversas infecções durante a gravidez são associadas com o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas secundárias às alterações no processo de neurodesenvolvimento. Entretanto, as consequências neuropsiquiátricas da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV durante a gravidez ainda permanecem desconhecidas. Neste trabalho, usando um modelo de camundongos imunocompetentes C57BL/6, uma caracterização dos efeitos da infecção congênita pelo ZIKV foi realizada nos estágios iniciais da gravidez até a idade adulta da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Para isso, camundongos fêmeas grávidas foram inoculadas com 1×10^6 UFP/animal de ZIKV por via intraperitoneal no dia embrionário 5,5 na presença ou ausência do anticorpo monoclonal pan-flavivirus anti-envelope 4G2 para avaliar o fenômeno de aumento da infecção dependente de anticorpos (ADE). Os resultados revelaram que a infecção pelo ZIKV induziu ativação imune materna (AIM), na qual foi associada com a ocorrência de alterações embrionárias e morte fetal. Importaneamente, a administração terapêutica do peptídeo antiviral AH-D durante os estágios iniciais da gravidez preveniu a replicação do ZIKV e reduziu a morte da prole. No período pós-natal da prole, a infecção congênita pelo ZIKV foi associada com uma redução no volume cerebral, anormalidades oftalmológicas, alterações na morfologia testicular e o comprometimento da microarquitetura óssea. Algumas alterações foram exacerbadas na presença do anticorpo 4G2. Além disso, as alterações neuropatológicas induzidas pelo ZIKV não refletiram em anormalidades comportamentais nos animais machos da prole adulta, mesmo quando submetidos a um segundo insulto ambiental no período pré-púbere. De forma geral, os resultados revelaram que a infecção materna pelo ZIKV causa diversas alterações congênitas em camundongos imunocompetentes, as quais podem ser exacerbadas pelo fenômeno de ADE e estão associados com AIM. Adicionalmente, o tratamento antiviral com o peptídeo AH-D pode ser benéfico durante a infecção pelo ZIKV no início da gestação.

Palavras-chave: Zika vírus. Infecção congênita pelo Zika vírus. Síndrome Congênita do Zika. Ativação Imune Materna. Aumento da infecção dependente de anticorpos.

Abstract

Zika virus (ZIKV) infection is associated with serious birth defects, including microcephaly, sensory, articular and muscle abnormalities, among others, which are defined as Congenital Zika Syndrome. Several infections during pregnancy are associated with the development of neuropsychiatric disorders secondary to changes in the neurodevelopmental process. However, neuropsychiatric consequences in the offspring born to ZIKV-infected dams are still unknown. Here, using an immunocompetent C57BL/6 mouse model, we performed an in-depth characterization of the effects of congenital ZIKV infection in the early stages of pregnancy until adulthood of offspring born to infected dams. For that, mouse pregnant dams were inoculated with 1×10^6 PFU/mouse of ZIKV by intraperitoneal route on the embryonic day 5.5 in the presence or absence of anti-envelope pan-flavivirus monoclonal antibody 4G2 to evaluate the phenomenon of antibody-dependent enhancement (ADE). Our results revealed that ZIKV induced maternal immune activation (MIA), which was associated with the occurrence of fetal alterations and death. Importantly, therapeutic administration of antiviral peptide AH-D during the early stages of pregnancy prevented ZIKV replication and reduced death of offspring. During the post-natal period, congenital ZIKV infection was associated with a reduction in whole brain volume, ophthalmological abnormalities, changes in the testicular morphology, and disruption in bone microarchitecture. Some alterations were enhanced in the presence of 4G2 antibody. Moreover, neuropathological alterations induced by ZIKV did not reflect on behavioral abnormalities in the male adult offspring, even when subjected to a second environmental hit during the peripubertal period. Overall, our results revealed that early maternal ZIKV infection causes several birth defects in immunocompetent mice, which can be potentiated by the ADE phenomenon and are associated with MIA. Additionally, antiviral treatment with AH-D peptide may be beneficial during early maternal ZIKV infection.

Keywords: Zika virus. Congenital Zika virus infection. Congenital Zika Syndrome. Maternal immune Activation. Antibody-Dependent Enhancement.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Infecções humanas pelo Zika virus ao longo do tempo, de 2007 a março de 2016	21
Figura 2: Transmissão do Zika virus no mundo atualmente	22
Figura 3: Estrutura de criomicroscopia eletrônica do Zika virus	26
Figura 4: Esquema dos diferentes ciclos de transmissão do Zika virus	29
Figura 5: Comparação entre um bebê normal com aquele que apresenta microcefalia ou microcefalia grave	34
Figura 6: A entrada do ZIKV na célula hospedeira, replicação e interação com vias celulares	35
Figura 7: O tropismo do ZIKV para diferentes células e tecidos.....	37
Figura 8: Distribuição global dos principais flavivírus	41
Figura 9: Mecanismo proposto para o aumento dependente de anticorpos (ADE) da infecção pelo ZIKV mediada por anticorpos anti-DENV com reatividade cruzada ..	44
Figura 10: Representação esquemática da estratégia experimental para avaliar a ativação imune materna	55
Figura 11: Representação esquemática da estratégia experimental para avaliar as consequências do aumento da infecção materna pelo ZIKV dependente de anticorpos ao nível embrionário	56
Figura 12: Estratégia experimental para avaliar a eficácia terapêutica do peptídeo AH-D em reduzir consequências adversas da SCZ	56
Figura 13: Representação esquemática da estratégia experimental para avaliar as consequências a longo prazo da infecção pelo ZIKV durante a gestação e a exacerbação de anormalidades do neurodesenvolvimento relacionadas à SCZ pela injeção do anticorpo pan-flavivirus 4G2	57
Figura 14: Análise da carga viral e dos níveis de mediadores inflamatórios alterados após infecção pelo ZIKV na presença ou ausência de anticorpos pan-flavivirus	74

Figura 15: Citocinas do baço das fêmeas grávidas não alteradas após a infecção pelo ZIKV	75
Figura 16: Citocinas do plasma das fêmeas grávidas não alteradas após a infecção pelo ZIKV.....	76
Figura 17: Alterações na viabilidade fetal devido a infecção pelo ZIKV	77
Figura 18: Alterações embrionárias e a carga viral associadas com a infecção pelo ZIKV	78
Figura 19: Avaliação das concentrações de mediadores inflamatórios na placenta após a infecção pelo ZIKV.....	79
Figura 20: Avaliação das concentrações de mediadores inflamatórios no cérebro fetal após a infecção pelo ZIKV.....	80
Figura 21: Peso corporal das fêmeas grávidas e sobrevivência da prole após o nascimento	81
Figura 22: Análise de neurodesenvolvimento da prole após infecção materna pelo ZIKV	82
Figura 23: Análise de MRI do cérebro dos animais machos da prole com 12 semanas de idade	83
Figura 24: Análise histopatológica do cérebro da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV.....	85
Figura 25: Análise de neurodegeneração no cérebro da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV	86
Figura 26: Contagem de micróglia no cérebro da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV.....	87
Figura 27: Contagem de astrócitos no cérebro da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV.....	88
Figura 28: Contagem de neurônios no cérebro da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV.....	89

Figura 29: Avaliação da pressão intraocular da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV	92
Figura 30: Contagem de células ganglionares da retina da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV	93
Figura 31: Avaliação da apoptose de células ganglionares da retina da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV.....	94
Figura 32: Micrografias dos compartimentos tubulares dos testículos da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV.....	96
Figura 33: Imuno-histoquímica de caspase-3 dos compartimentos tubulares dos testículos da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV	97
Figura 34: Análise morfométrica dos compartimentos tubulares dos testículos da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV	98
Figura 35: Micrografias dos compartimentos intertubulares dos testículos da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV	99
Figura 36: Análise morfométrica dos compartimentos intertubulares dos testículos da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV	100
Figura 37: Análise morfométrica da estrutura de alterações na microestrutura óssea da prole associada com a infecção pelo ZIKV.....	101
Figura 38: Alterações celulares associadas com a perda óssea da prole resultante da infecção pelo ZIKV	103
Figura 39: Alterações moleculares associadas com a perda óssea da prole resultante da infecção pelo ZIKV	104
Figura 40: Avaliação da diferenciação de BMCs em osteoclastos	105
Figura 41: Avaliação da diferenciação de BMCs em osteoblastos.....	106
Figura 42: Viabilidade fetal e carga viral após tratamento com peptídeo AH-D	108
Figura 43: Avaliação de alterações neuropatológicas da prole adulta resultantes de dois insultos ambientais	110

Figura 44: Representação esquemática dos principais achados do estudo.....122

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

4G2: anticorpo monoclonal anti-proteína E de flavivírus

ADE: aumento da infecção dependente de anticorpos

ADEi: ADE intrínseco

AIM: Ativação Imune Materna

AXL: receptor tirosino-quinase AXL

BMC: células de medula óssea

BMD: densidade mineral óssea

BV: volume ósseo

CCL: citocinas ligantes com motivo C-C

CGR: células ganglionares da retina

CXCL: quimiocinas com motivo C-X-C

DC-SIGN: Receptor *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DE: dia embrionário

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Fc: fragmento cristalizável

FcR: receptores de imunoglobulinas

HE: coloração por Hematoxilina e Eosina

IFN: interferon

Ig: imunoglobulinas

IL: interleucina

i.p: via intraperitoneal

microCT: microtomografia computadorizada

MRI: *magnetic resonance imaging*

NF-κB: fator nuclear de transcrição kappa B

NPCs: células progenitoras neurais

OPG: osteoprotegerina

PBS: tampão fosfato-salino

PIO: pressão intraocular

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RANK: receptor ativador do fator nuclear kappa-B

RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B

RT-qPCR: Transcrição Reversa por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SBG: Síndrome de Guillain-Barré

SCZ: Síndrome Congênita do Zika

SMI: índice de modelo de estrutura

Tb.N: número das trabéculas

Tb.Th: espessura das trabéculas

Tb.Sp: separação das trabéculas

TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta

TLR: receptores do tipo Toll

TNF: fator de necrose tumoral

TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1) Breve histórico e contexto atual da Zika	19
1.2) O <i>Zika virus</i>	24
1.3) Transmissão do <i>Zika virus</i>	26
1.4) Aspectos clínicos da infecção pelo Zika virus.....	30
1.5) Patogênese da Zika.....	34
1.6) Alterações do Neurodesenvolvimento induzidas pelo ZIKV	46
1.7) Estratégias terapêuticas contra a infecção pelo ZIKV	48
2. JUSTIFICATIVA	51
3. OBJETIVOS	52
3.1) Objetivo geral	52
3.2) Objetivos específicos.....	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1) Ética em Experimentação Animal	53
4.2) Vírus, cultura celular e anticorpos	53
4.3) Animais e protocolos experimentais	54
4.4) Determinação da carga viral.....	57
4.5) Mensuração dos níveis de citocinas no soro e tecidos por ELISA	59
4.6) Análise de neurodesenvolvimento da prole	60
4.6.1) Teste de sociabilidade	60
4.6.2) Labirinto em Y.....	61

4.6.3) Labirinto em cruz elevado	61
4.6.4) Teste de campo aberto	61
4.6.5) Teste de preferência a sacarose	62
4.6.6) Análise neuropatológica usando modelo de dois insultos ambientais	62
4.6.7) Teste de memória social	64
4.6.8) Teste de enterramento de esferas	64
4.7) Análise de Ressonância Magnética	65
4.8) Análise histopatológica e imuno-histoquímica do cérebro	65
4.9) Análise oftalmológica da prole	66
4.9.1) Medição da pressão intraocular	66
4.9.2) Análise histopatológica	67
4.10) Análise testicular da prole	67
4.10.1) Preparação dos tecidos	67
4.10.2) Análises morfométricas do parênquima testicular e túbulos seminíferos	68
4.10.3) Número de células	68
4.10.4) Análise de imunocoloração	69
4.11) Análise óssea da prole	69
4.11.1) Microtomografia computadorizada	69
4.11.2) Cultura de células	70
4.11.3) Histomorfometria	70
4.11.4) Extração de RNA e qPCR	71
4.12) Análise estatística	71

5. RESULTADOS	73
5.1) A infecção pelo Zika virus induz a Ativação Imune Materna (AIM).....	73
5.2) A infecção pelo ZIKV induz dano placentário e fetal, que é agravado pelo pré-tratamento com anticorpo 4G2.....	76
5.3) A infecção pelo Zika virus induz abnormalidades neuropatológicas na prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV.....	80
5.4) A infecção congênita pelo ZIKV não é associada com disfunções motoras e cognitivas da prole na vida adulta	89
5.5) A infecção congênita pelo ZIKV resulta em anormalidades oftalmológicas na prole.....	91
5.6) A infecção congênita pelo ZIKV resulta em alterações morfológicas testiculares da prole adulta.....	94
5.7) A infecção congênita pelo ZIKV afeta a qualidade óssea da prole adulta	100
5.8) A administração terapêutica de um peptídeo antiviral (AH-D) reduz a frequência de infecção viral e a morte fetal induzida pela infecção congênita pelo ZIKV	107
5.9) A infecção congênita pelo ZIKV associada ao estresse no período pós-natal não causa alterações comportamentais da prole na vida adulta	108
6. DISCUSSÃO	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
9. ANEXOS	143
9.1) Anexo 1: Artigo científico publicado em periódico indexado.....	143
9.2) Anexo 2: Capítulo de livro publicado	157

9.3) Anexo 3: Protocolos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), número 217/2017 e 194/2019.....	172
--	-----

1. INTRODUÇÃO

1.1) Breve histórico e contexto atual da Zika

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus emergente transmitido principalmente por culicídeos do gênero *Aedes*. A doença causada pela infecção do ZIKV recebeu grande atenção, devido à sua relação com complicações neurológicas graves e distúrbios no desenvolvimento de bebês nascidos de mães infectadas pelo vírus durante a gestação e também com as complicações neurológicas em indivíduos adultos, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) (CAO-LORMEAU et al., 2016; RASMUSSEN et al., 2016).

O ZIKV foi isolado inicialmente a partir do soro de um macaco Rhesus sentinela na Floresta de Ziika, Uganda, em abril de 1947, e também a partir de mosquitos *Aedes africanus* em janeiro de 1948 na mesma localidade, durante um estudo buscando isolar o vírus da febre amarela na natureza (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). A infecção pelo ZIKV em humanos foi descrita pela primeira vez em 1953, na Nigéria, onde o vírus foi isolado de um paciente sintomático, enquanto outros dois apresentaram anticorpos contra esse vírus (MACNAMARA, 1954).

Apesar de terem sido descritos casos de infecção humana pelo ZIKV em diferentes regiões da África e Ásia, o vírus não recebeu grande importância até abril de 2007, quando ocorreu uma epidemia na ilha de Yap, na Micronésia, resultando na infecção de aproximadamente 73% da população local. Entretanto, apesar do elevado número de casos, nenhuma hospitalização ou morte relacionada à infecção pelo ZIKV foi confirmada (DUFFY et al., 2009; FAYE et al., 2014).

Após esse acontecimento, houve um novo período sem registros epidêmicos. Porém, entre outubro de 2013 e abril de 2014, uma nova epidemia foi registrada na Polinésia Francesa, na região Sul do Pacífico, onde foi estimado que aproximadamente 32 mil pessoas apresentaram infecção sintomática pelo ZIKV, número correspondente à 11,5% da população daquela região (268.207 habitantes) (CAO-LORMEAU et al., 2014; MALLET; VIAL; MUSSO, 2015). Além disso, durante essa epidemia, estudos retrospectivos demonstraram que houve um inesperado aumento na incidência de SGB nessa população (MALLET; VIAL; MUSSO, 2015). Esta síndrome, apesar de rara, com incidência de aproximadamente 1,1 casos por 100.000 pessoas por ano, é considerada a mais comum e grave neuropatia paralítica

periférica aguda (DONOFRIO, 2017). Durante a epidemia na Polinésia Francesa, ocorreram 42 casos de SGB, uma incidência 20 vezes maior que o esperado para a sua população, indicando uma possível relação entre SGB e a infecção pelo ZIKV (MALLET; VIAL; MUSSO, 2015; OEHLER et al., 2014).

Posteriormente, ocorreram surtos menores em outras regiões do Pacífico em 2014 e 2015 (Figura 1) (PETERSEN et al., 2016). Foi então que em março de 2015, o vírus emergiu pela primeira vez nas Américas, quando o ZIKV foi isolado durante uma epidemia de uma doença maculoexantemática na Bahia, estado do nordeste do Brasil (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). Desde a sua introdução no Brasil, possivelmente entre 2013 (DE LIMA CAMPOS et al., 2018) e 2014 (MASSAD et al., 2017), o ZIKV se espalhou rapidamente nas Américas e vários outros países. Dados de julho de 2019 mostram que a transmissão do vírus havia sido documentada em 87 países e territórios diferentes, sendo que a transmissão ainda ocorre em 26 destas regiões (Figura 2) (WHO, 2019). Segundo estimativas do Ministério da Saúde, entre 440 mil e 1,3 milhões de infecções pelo ZIKV podem ter ocorrido no Brasil em 2015, período que a epidemia iniciou no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Enquanto ocorreram 216.207 casos prováveis de infecção pelo ZIKV em 2016, nos anos seguintes ocorreu uma grande redução no número de casos, embora ainda haja a circulação do vírus atualmente, sendo 17.593, 8.680, 10.708 e 2.545 os números de casos prováveis de Zika notificados no país em 2017 (SAÚDE, 2018), 2018 (SAÚDE, 2019), 2019 (SAÚDE, 2020a) e 2020, até a semana epidemiológica 20 (SAÚDE, 2020b), respectivamente. Embora a maioria dos países das Américas e Caribe manifestaram um declínio nos casos de Zika desde o fim de 2017, a reintrodução do vírus e a exposição de população não imune pode ocorrer, principalmente nas áreas em que ocorre a circulação do vetor artrópode (ECDC, 2019).

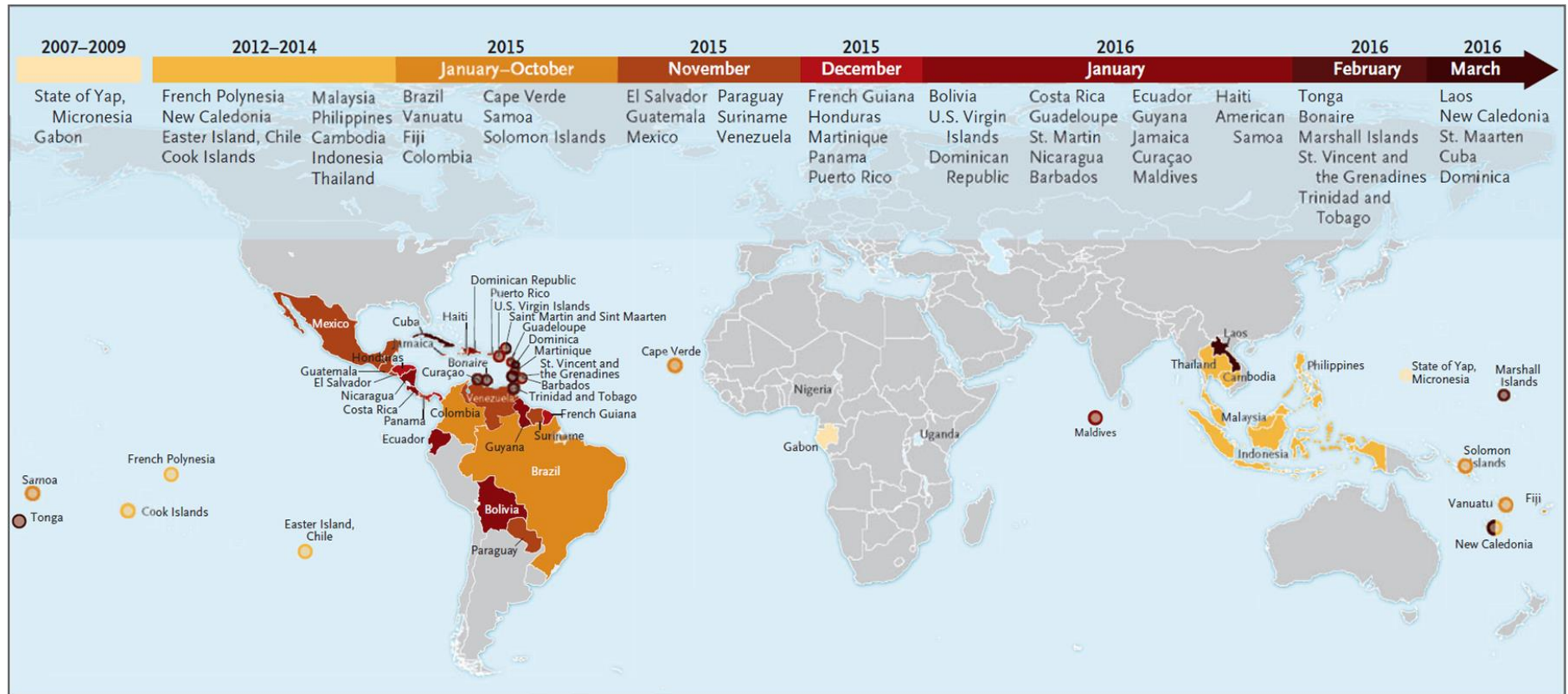


Figura 1: Infecções humanas pelo Zika vírus ao longo do tempo, de 2007 a março de 2016. Regiões em cores mais escuras representam registros de infecções humanas pelo ZIKV mais recentes. Fonte: Petersen e colaboradores (2016).

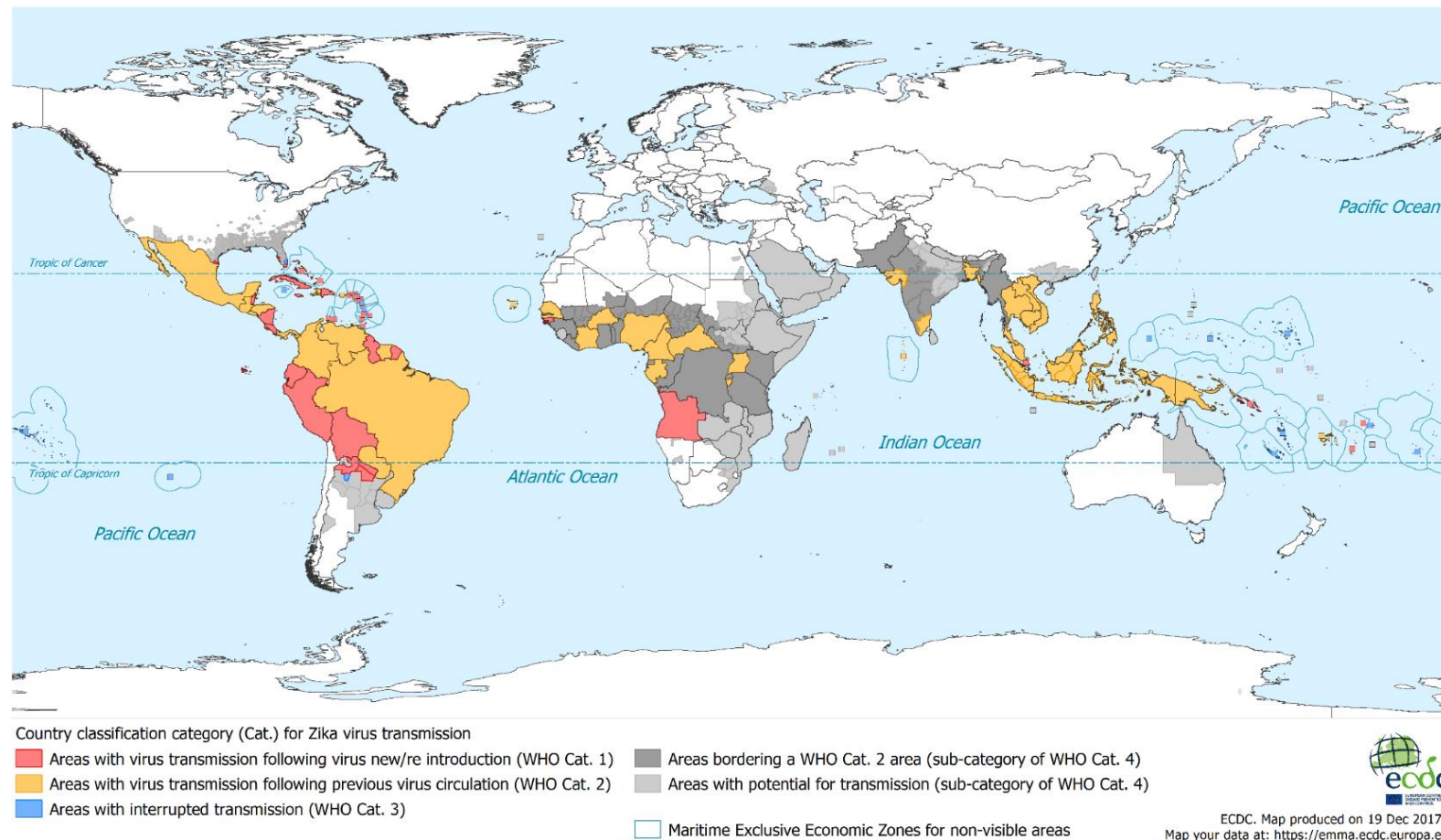


Figura 2: Transmissão do Zika vírus no mundo atualmente. Mapa gerado de acordo com as categorias de transmissão do Zika vírus estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde. Categoria 1 (vermelha) representa áreas que houve nova ou reintrodução do vírus e também há transmissão atualmente. Categoria 2 (amarela) representa áreas com evidência de circulação antes de 2015, mas que não há evidência de interrupção dessa transmissão. Categoria 3 (azul) representa áreas com transmissão interrompida e com potencial para futura transmissão. Categoria 4 (cinza) representa áreas com competência vetorial estabelecida, mas sem transmissão passada ou atual registrada; a subcategoria em cinza escuro é diferenciada de sua contrapartida por representar áreas em que possam ocorrer transmissão por estarem próximas às regiões da Categoria 2, sendo pertencentes à mesma zona ecológica e com evidência de transmissão do *Dengue virus*. Fonte: European Centre for Disease Prevention and Control. (2018).

Semelhante ao observado na epidemia na Polinésia Francesa, houve um aumento incomum no número de manifestações neurológicas em adultos e bebês nascidos de mães infectadas após a introdução do ZIKV no Brasil. Segundo um alerta da Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) / OMS publicado em dezembro de 2015, 76 pacientes com síndromes neurológicas e histórico de infecção pelo ZIKV recente foram identificados até 13 de julho de 2015, sendo 42 destes diagnosticados como SGB. Entre estes, 62% (26/42) apresentaram sintomas relacionados à Zika antes do início dos sintomas neurológicos (PAN AMERICAN HEALTH ORGANISATION, 2015). Em novembro de 2015, foi reportado que 10 de 224 pacientes com casos suspeitos de dengue apresentavam infecção pelo ZIKV, sendo que 7 destes apresentavam sintomas neurológicos. Situação semelhante também foi observada em El Salvador, em janeiro de 2016 (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2016). Ainda mais importante, foi registrado um inesperado aumento no número de recém-nascidos com microcefalia e alterações neurológicas associadas, caracterizadas pela redução no perímetro cefálico fetal (COULOMBIER et al., 2015). No Brasil, enquanto 150-200 casos de microcefalia foram notificados anualmente entre 2010 e 2014, 7.623 casos de microcefalia foram notificados de outubro de 2015 a maio de 2016 (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2016). Desde 2015 até início de janeiro de 2018, o número de casos confirmados de síndrome congênita associados à infecção pelo ZIKV foi de 2.952, o que correspondeu à 79% do total de casos em todas as Américas neste período (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Corroborando com esses achados, uma análise retrospectiva dos dados referentes ao período da epidemia de ZIKV na Polinésia Francesa revelou um elevado número de casos de microcefalia, sugerindo uma forte relação entre a infecção pelo ZIKV durante a gravidez e a microcefalia (CAUCHEMEZ et al., 2016). Por fim, baseado nessas evidências sobre o potencial teratogênico do ZIKV, em abril de 2016, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA confirmou a relação causal entre a infecção pelo ZIKV e microcefalia e outras anomalias graves do desenvolvimento cerebral (MLAKAR et al., 2016; RASMUSSEN et al., 2016). Neste período, o ZIKV foi considerado pela OMS uma emergência de saúde pública de importância internacional, a qual foi posteriormente encerrada em 18 de novembro de 2016 (GULLAND, 2016; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2016).

1.2) O Zika virus

O *Zika virus* (ZIKV) pertence ao reino *Riboviria*, família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus* (MUSSO; GUBLER, 2016). Este gênero também inclui importantes patógenos humanos, como o *Dengue virus* (DENV), o vírus da Febre Amarela (YFV – *Yellow Fever Virus*), o vírus do Oeste do Nilo (WNV – *West Nile Virus*), o vírus da Encefalite Japonesa (JEV – *Japanese Encephalitis Virus*), o vírus da Encefalite transmitida por Carrapatos (TBEV – *Tick-borne Encephalitis Virus*), entre outros (CULSHAW; MONGKOLSAPAYA; SCREATON, 2018). O ZIKV apresenta diferentes linhagens conhecidas, sendo a primeira delas a Leste Africana, a qual deu origem às outras duas linhagens: Oeste Africana e Asiática (LANCIOTTI et al., 2016). Amostras virais isoladas nas Américas pertencem ao genótipo asiático e foram derivadas das amostras envolvidas nas epidemias de Yap, Camboja, Tailândia e Polinésia Francesa em 2013 (FARIA et al., 2016).

Assim como outros flavivirus, o genoma do ZIKV é constituído de RNA fita simples e polaridade positiva, apresentando aproximadamente 10,7 kb contendo regiões 3' e 5' não traduzidas que flanqueiam a sequência de uma única poliproteína, na qual dá origem a todas as proteínas estruturais [capsídeo (C), precursora de membrana (prM)/membrana (M) e envelope (E)] e não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) do vírus (CULSHAW; MONGKOLSAPAYA; SCREATON, 2018).

O ciclo de multiplicação do ZIKV ainda não foi completamente elucidado (MUSSO; GUBLER, 2016). Ainda assim, esse ciclo é semelhante a outros membros da família *Flaviviridae*. Em geral, o ciclo tem início através da ligação e internalização da partícula viral à célula hospedeira por um processo conhecido como endocitose mediada por receptor, o qual está presente na membrana da célula hospedeira. No endossomo, o ambiente ácido induz a fusão das membranas celular e viral, ocorrendo, então, a liberação do nucleocapsídeo e, conseqüentemente, o RNA genômico no citoplasma (LINDENBACH B., THIEL H., 2007).

O RNA é traduzido, provavelmente, logo após essa liberação, onde a porção N-terminal da poliproteína nascente contém um peptídeo sinal de direcionamento ao retículo endoplasmático (RE). Assim, ocorre a rápida associação dos ribossomos que estão traduzindo o RNA viral com membranas do RE. Essa associação resulta em uma complexa localização das proteínas codificadas pelo genoma viral durante a

tradução no RE. As proteínas PrM, E, NS1, e algumas sequências da NS2A, NS4A e NS4B estarão localizadas internamente, no lúmen do RE. Já as proteínas C, NS3 e NS5 estarão situadas externamente ao RE, ou seja, no citoplasma celular. Além disso, algumas sequências das proteínas NS2A, NS2B e NS4B estarão transversais à bicamada lipídica do RE (GARCIA-BLANCO et al., 2016; SAGER et al., 2018). O complexo protease NS2B-NS3, codificado pelo genoma viral, processa a poliproteína viral em peptídeos individuais, clivando as ligações localizadas na porção citoplasmática do RE. Além disso, proteases celulares e sinal-peptidase clivam ligações expostas no lúmen do RE (GARCIA-BLANCO et al., 2016).

A fita de RNA viral, que possui polaridade positiva, é usada na sua replicação para a produção inicial de uma fita de RNA complementar com polaridade negativa. Em seguida, essa fita negativa é usada para a produção de múltiplas cópias de fitas de RNA com polaridade positiva. Então, essas sequências de polaridade positiva podem ser usadas para novos ciclos de replicação/tradução ou para montagem de novas partículas virais (GARCIA-BLANCO et al., 2016). Essa montagem de novas partículas virais ocorre em estruturas sub-celulares associadas ao RE. As partículas imaturas são transportadas à face trans do complexo de Golgi para a maturação dos vírions, processo que acontece após a clivagem da proteína prM para M mediado pela enzima furina (CHIRAMEL; BEST, 2018). Por fim, as novas partículas virais montadas são liberadas no meio extracelular por exocitose (LINDENBACH B., THIEL H., 2007).

A estrutura da partícula viral madura do ZIKV é semelhante ao DENV e WNV, como demonstrado por criomicroscopia eletrônica (Figura 3A). A principal diferença entre as estruturas do ZIKV (Figura 3B) e DENV está na região dos sítios de glicosilação na glicoproteína E, os resíduos Asparagina 154 (Asn¹⁵⁴) no ZIKV e Asn¹⁵³ no DENV (Figura 3C). Além disso, apenas um sítio de glicosilação (Asn¹⁵⁴) é encontrado na glicoproteína E do ZIKV, enquanto o DENV possui dois sítios de glicosilação (Asn⁶⁷ e Asn¹⁵⁴). Uma vez que o DENV se liga ao receptor DC-SIGN (*Dendritic Cell Specific ICAM-3-Grabbing Non Integrin*) por meio da sua interação com glicanos localizados nos resíduos Asn⁶⁷ de duas glicoproteínas E adjacentes, essa diferença entre as estruturas virais pode implicar em uma variação no tropismo celular do ZIKV ou em diferentes manifestações da doença (POKIDYSHEVA et al., 2006; SIROHI et al., 2016).

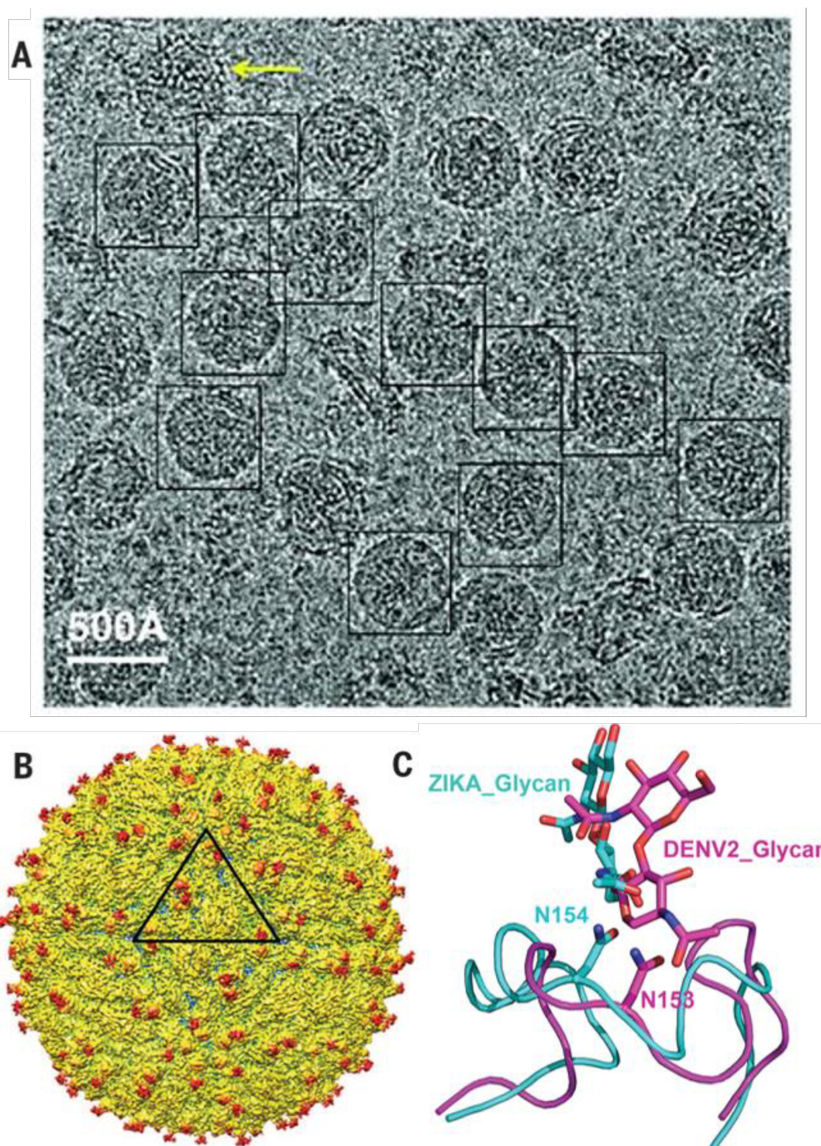


Figura 3: Estrutura de criomicroscopia eletrônica do Zika virus. A) Partículas virais maduras do ZIKV estão mostradas dentro das caixas pretas, enquanto uma partícula parcialmente madura está indicada pela seta amarela. B) Estrutura da partícula viral madura do ZIKV. C) Superposição das regiões em torno dos sítios de glicosilação (resíduos 144 a 166 do ZIKV; resíduos 144 a 161 do DENV-2) que flanqueiam o glicano Asn¹⁵⁴ do ZIKV (em azul) e o glicano Asn¹⁵³ do DENV (em rosa). Adaptado de: Sirohi e colaboradores (2016).

1.3) Transmissão do Zika virus

O ZIKV circula na natureza por meio de dois ciclos de transmissão. Um ciclo enzoótico, onde ocorre a transmissão do vírus entre primatas não humanos e espécies silvestres de *Aedes* spp; e um ciclo urbano, sendo o vírus transmitido entre humanos e espécies domésticas e peridomésticas de *Aedes* spp (WEAVER et al., 2016). No ciclo urbano, as principais espécies transmissoras do ZIKV são *A. aegypti* e *A. albopictus* (RAMOS DA SILVA; GAO, 2016). Desta forma, esse vírus possui um

grande potencial de expansão geográfica para países onde mosquitos *Aedes* spp., especialmente *A. aegypti*, estão presentes (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016).

O ZIKV foi isolado inicialmente de *A. africanus* (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Posteriormente, o vírus foi isolado de *A. aegypti* em 1966, representando o primeiro isolamento do ZIKV no continente Asiático e também em outra espécie vetorial além do *A. africanus* (MARCHETTE; GARCIA; RUDNICK, 1969). Atualmente, o vírus já foi isolado de outras espécies de *Aedes*, como *A. furcifer*, *A. taylori*, *A. luteocephalus*, *A. vittatus*, entre outras (DIALLO et al., 2014; MUSSO; GUBLER, 2016). Além disso, o ZIKV foi isolado de um *pool* de *A. furcifer* machos, indicando fortemente que o vírus também é transmitido verticalmente nesta espécie, pois são as fêmeas que realizam o repasto sanguíneo, o que pode ser um importante mecanismo de manutenção do vírus na natureza. Por fim, o ZIKV foi isolado de outras espécies de mosquitos em Senegal, como *Anopheles coustani*, *Culex perfuscus* e *Mansonia uniformis*. No entanto, apesar do vírus ter sido isolado uma única vez, o isolamento viral a partir destas espécies não implica que elas também sejam vetores do ZIKV, por isso, estudos para verificar essa possibilidade são necessários (DIALLO et al., 2014).

Nas Américas, as únicas espécies de *Aedes* conhecidas são *A. aegypti* e *A. albopictus* (PETERSEN et al., 2016). Surpreendentemente, apesar de serem susceptíveis à infecção viral, elas possuem baixa capacidade vetorial do genótipo Asiático do ZIKV, determinada pela baixa presença do vírus na saliva coletada da probóscide dos mosquitos após alimentação em uma amostra de sangue infectada. Porém, isso pode ser contrabalanceado pelo alto nível de infestação desses mosquitos e seu contato próximo com os humanos (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016). De forma geral, as observações na região do Pacífico, onde o ZIKV pode ter sido transmitido por diferentes espécies do vetor, *A. hensilli* na ilha de Yap e *A. aegypti* e/ou *A. polynesiensis* na Polinésia Francesa, indicam que o vírus é altamente adaptável e não possui uma espécie vetorial principal (MUSSO; GUBLER, 2016).

Durante a epidemia no Brasil, foi fortemente sugerido que mosquitos *Culex* spp. poderiam estar envolvidos na transmissão do ZIKV. O vírus foi detectado no intestino médio, glândulas salivares e saliva de *C. quinquefasciatus* alimentados artificialmente. Além disso, mosquitos infectados pelo ZIKV foram coletados em uma região com alta incidência de microcefalia associada ao ZIKV (Recife, Brasil), dos quais o vírus foi isolado e sequenciado parcialmente (GUEDES et al., 2017). Embora outro trabalho tenha demonstrado dados semelhantes anteriormente (GUO et al., 2016), outros

pesquisadores reportaram que *C. quinquefasciatus* e *C. pipens* não foram capazes de transmitir o ZIKV (AMRAOUI et al., 2016). De acordo com o último estudo citado, *C. quinquefasciatus* coletados no estado do Rio de Janeiro não foram capazes de transmitir cepas do ZIKV isoladas de casos humanos daquela região (FERNANDES et al., 2016). Dessa forma, embora os dados sejam controversos, esses culicídeos se apresentam como potenciais vetores do ZIKV e estudos adicionais devem ser conduzidos.

Além da transmissão tradicional via picada por culicídeos do gênero *Aedes*, diferentes vias de transmissão do ZIKV (Figura 4) já foram relatadas, como por transfusão sanguínea, transmissão sexual e transmissão materno-fetal (KURSCHEIDT et al., 2019). A transmissão de arbovírus, incluindo o DENV e o WNV, por transfusão de produtos derivados do sangue já foi descrita anteriormente (MUSSO; GUBLER, 2016; PETERSEN; BUSCH, 2010). Corroborando essa hipótese, durante a epidemia de ZIKV ocorrida na Polinésia Francesa, amostras de doadores de sangue foram testadas para detecção do RNA viral, sendo encontradas amostras positivas de doadores assintomáticos no momento da doação. Embora a infecção pelo ZIKV por transfusão sanguínea não tenha sido registrada durante essa epidemia, essa possibilidade não pode ser descartada (BIERLAIRE et al., 2014; MUSSO; GUBLER, 2016). Ainda, a primeira sequência completa do ZIKV descrita no Brasil foi obtida a partir do vírus isolado de um paciente que recebeu transfusão sanguínea de um doador assintomático (CUNHA et al., 2016).

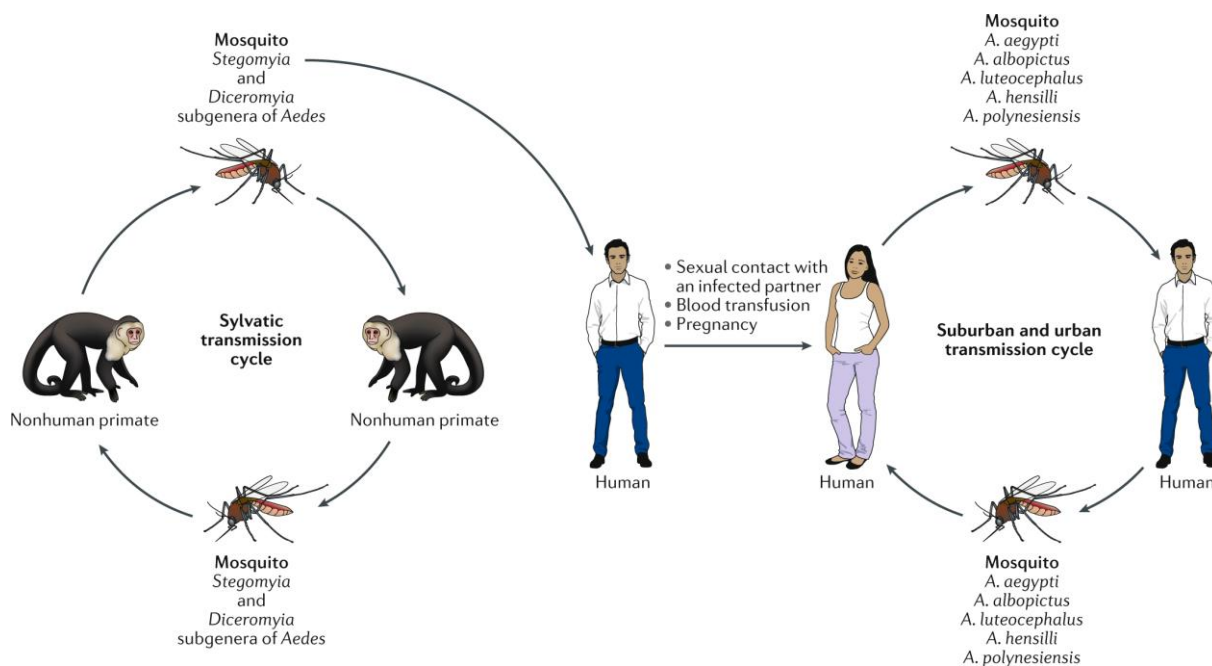


Figura 4: Esquema dos diferentes ciclos de transmissão do Zika vírus. O Zika vírus é transmitido entre primatas não humanos e mosquitos *Aedes* (subgêneros *Stegomyia* e *Diceromyia*) num ciclo silvestre na África, onde eventual *spillover* pode ocorrer. Nos ambientes urbanos e periurbanos, o vírus é transmitido para humanos principalmente por mosquitos *Aedes aegypti*. A transmissão por outras vias também possa ocorrer, como sexual com um parceiro infectado, transfusão sanguínea e durante a gravidez. Fonte: Kurscheidt e colaboradores (2019).

Um caso ocorrido em 2008 havia sugerido a ocorrência de transmissão sexual do ZIKV. Um cientista americano desenvolvendo um trabalho de campo em Senegal apresentou sintomas relacionados à infecção pelo ZIKV logo após retornar aos EUA. A esposa do cientista nunca havia viajado para Ásia ou África e não havia saído dos EUA desde 2007. Ainda, as condições climáticas não eram compatíveis com a dinâmica de transmissão do ZIKV por *Aedes* spp. e por fim, o casal mantivera relações sexuais antes do paciente apresentar os sintomas da doença e a esposa desenvolveu os sintomas 9 dias após o retorno do seu marido. Embora o vírus não tenha sido isolado, testes sorológicos indicaram infecção pelo ZIKV. Tais fatores sugeriram fortemente uma possível transmissão por via sexual. Entretanto, outra possibilidade seria a transmissão por contato direto ou por outros fluidos corporais, como saliva, mas nenhum dos quatro filhos dos pacientes desenvolveu sintomas da doença (FOY et al., 2011). Em seguida, outras evidências rapidamente foram reportadas, como a detecção do RNA de ZIKV em amostras de sêmen e urina, além do isolamento do vírus a partir da amostra de sêmen de um paciente durante a epidemia ocorrida na Polinésia Francesa em 2013 (MUSSO et al., 2015), a detecção do RNA viral por qPCR

em uma amostra de sêmen de um paciente após retornar das ilhas Cook em 2014 (ATKINSON et al., 2016), a detecção do RNA viral no sêmen por 6 meses após o início dos sintomas (NICASTRI et al., 2016), além de relatos de caso ocorridos na França (D'ORTENZIO et al., 2016; FRÉOUR et al., 2016) e EUA em 2016 (HILLS et al., 2016; MCCARTHY, 2016) apoiaram a hipótese de que o ZIKV poderia ser sexualmente transmitido. Atualmente, essa forma de transmissão do vírus já é bem reconhecida (RUSSELL et al., 2017).

Por fim, dois casos de transmissão materno-fetal de ZIKV foram registrados durante a epidemia ocorrida na Polinésia Francesa (BESNARD et al., 2014). A partir das evidências demonstradas nestes casos, diversas formas de transmissão foram consideradas: (A) transplacentária; (B) durante o parto; (C) durante amamentação ou (D) pelo contato próximo entre mãe e seu recém-nascido. Corroborando essas hipóteses, RNA viral foi detectado por qPCR, em diferentes ocasiões: em amostras de soro, urina e leite materno. Apesar do RNA viral não ter sido detectado no soro de um dos recém-nascidos no dia do parto, o que pode indicar que não ocorreu transmissão via transplacentária, o RNA viral foi detectado nas amostras de leite materno e no soro do recém-nascido logo no dia seguinte ao início da amamentação, sugerindo que a infecção desta criança não ocorreu via amamentação. Entretanto, apesar de partículas virais viáveis não terem sido detectadas nas amostras de leite materno, a detecção do RNA viral nessa amostra demonstra que essa via de transmissão não deve ser desconsiderada (BESNARD et al., 2014). Além disso, o genoma viral foi detectado e sequenciado a partir de amostras de líquido amniótico de duas mulheres grávidas, nos quais os fetos foram diagnosticados com microcefalia, no Brasil em 2016 (CALVET et al., 2016). Posteriormente, em um novo relato de caso, o genoma completo do ZIKV foi isolado a partir do cérebro de um feto com microcefalia, cuja mãe foi infectada no Brasil em 2015, confirmando, assim, um caso de transmissão materno-fetal do ZIKV (MLAKAR et al., 2016).

1.4) Aspectos clínicos da infecção pelo Zika virus

O período de incubação do ZIKV, que é o tempo entre a exposição ao vírus e o início dos sintomas, é de 6,8 dias, aproximadamente. Além disso, esse período normalmente não ultrapassa 15,4 dias (FOURIE et al., 2018).

A primeira descrição clínica da infecção pelo ZIKV foi reportada de um voluntário humano em 1956. O paciente recebeu uma dose viral por via subcutânea e apresentou enxaqueca, leve indisposição e febre após 3,5 dias após a inoculação. Nenhum outro sintoma foi registrado. Na manhã do 7º após a inoculação, o paciente se sentia bem e sua temperatura havia voltado ao normal (BEARCROFT, 1956).

Durante a epidemia na ilha de Yap em 2007, os pacientes com infecção confirmada pelo ZIKV apresentaram os seguintes sintomas: erupções cutâneas (90%), febre (65%), artrite ou artralgia (65%), conjuntivite (55%), mialgia (48%), enxaqueca (45%), dor retro orbital (39%), edema (19%) e vômito (10%). Na pesquisa sorológica realizada na região, entre os 557 residentes, 414 (74%) dos participantes apresentaram anticorpos IgM contra o ZIKV. Entre os participantes soropositivos, 154 (38%) relaram ter desenvolvido sintomas relacionados à infecção pelo ZIKV durante a epidemia, embora 27 (19%) pessoas entre os 143 soronegativos também relataram sintomas da doença naquele período (DUFFY et al., 2009). De acordo, durante a epidemia ocorrida na Polinésia Francesa e em um estudo conduzido com mulheres grávidas no Rio de Janeiro (Brasil), a frequência de sintomas apresentados nos casos confirmados foi semelhante à observada na epidemia de Yap (BRASIL et al., 2016; MALLETT; VIAL; MUSSO, 2015). Além disso, nenhuma hospitalização, complicação hemorrágica ou morte devido à infecção pelo ZIKV foi registrada na epidemia em Yap (DUFFY et al., 2009).

De forma geral, os sintomas apresentados com a infecção pelo ZIKV são semelhantes a outros arbovírus de importância médica, como DENV e Chikungunya virus (CHIKV). Uma comparação entre os sintomas está resumida na Tabela 1. Desta forma, o quadro clínico do paciente pode ser facilmente confundido entre estas infecções virais (HADDOW et al., 2012). Isso é bastante preocupante em regiões onde todos esses vírus estão presentes, como o Brasil. Em 2015, ano que o ZIKV foi introduzido no país, mais de 1,6 milhões de casos de dengue e mais de 20 mil casos de febre de Chikungunya foram notificados (SAÚDE, 2016). A co-circulação do DENV, CHIKV e ZIKV já havia sido observada neste período, em estudo realizado no estado de Pernambuco, localizado no nordeste do Brasil, sendo, inclusive, detectada a coinfeção de DENV-1 e ZIKV em dois pacientes. Embora a coinfeção viral não tenha causado efeitos sinérgicos graves nos pacientes estudados, o valor amostral deste trabalho foi pequeno, o que é uma limitação para suas conclusões. Deste modo, o efeito da coinfeção do ZIKV com outros arbovírus circulantes na gravidade da doença

precisa ser mais bem analisado (PESSOA et al., 2016). No entanto, a descrição da Zika como uma doença branda sem complicações graves foi baseada em apenas uma epidemia e um número limitado de casos. Posteriormente, essa percepção da doença mudou com as epidemias na Polinésia Francesa e Brasil, devido à ocorrência de complicações neurológicas graves relacionadas à infecção do ZIKV (MUSSO; GUBLER, 2016).

Tabela 1. Comparação entre alguns sintomas comuns em pacientes infectados por Zika virus, Dengue virus ou Chikungunya virus.

Apresentação clínica	Zika	Dengue	Chikungunya
Febre	+	+++	+++
Erupções cutâneas	+++	++	++
Mialgia	+	+++	+
Artralgia	++	+	+++
Edema	++	-	-
Dor retro orbital	+	++	+
Conjuntivite	+++	-	+++
Linfadenopatia	+	++	++
Hepatomegalia	-	-	+++
Hemorragia	-	+	-

Adaptado de Eckerle *et al.* (2018). +++ muito comum, ++ observado frequentemente, + observado ocasionalmente, + atípico.

A principal complicação neurológica observada em adultos durante as epidemias na Polinésia Francesa e no Brasil foi a SGB (MALLET; VIAL; MUSSO, 2015; PAN AMERICAN HEALTH ORGANISATION, 2015). Nessa síndrome, ocorre uma estimulação inadequada/exacerbada do sistema imune do hospedeiro associada a uma resposta imune celular e humoral contra componentes do sistema nervoso periférico (autoimunidade). Geralmente, isso é precedido por alguma infecção onde há similaridades entre antígenos do microrganismo causador da infecção e do sistema nervoso. Nesse processo, ocorrem lesões na mielina ou no axônio dos neurônios, gerando uma rápida e progressiva fraqueza dos membros, podendo também ocorrer manifestações generalizadas com complicações respiratórias potencialmente fatais (WILLISON; JACOBS; VAN DOORN, 2016).

Além da SGB, a ocorrência de anomalias fetais, sendo a principal delas a microcefalia (Figura 5), foi inicialmente observada durante a epidemia de ZIKV no Brasil, e também na Polinésia Francesa, após investigações retrospectivas (CAUCHEMEZ et al., 2016; PAN AMERICAN HEALTH ORGANISATION, 2015; PETERSEN et al., 2016). A microcefalia é uma condição caracterizada por um distúrbio no desenvolvimento neurológico, onde o cérebro do feto não se desenvolve normalmente e, desta forma, o crânio também não expande e as suturas cranianas podem se fechar prematuramente. Por isso, é observada a redução da circunferência occipital frontal do recém-nascido, abaixo da média de sua idade gestacional, gênero e etnia (COULOMBIER et al., 2015). Com a redução do volume cerebral, também são observadas incapacidades motoras e/ou intelectuais do paciente (CAUCHEMEZ et al., 2016).

Trabalhos subsequentes demonstraram que crianças nascidas de mães infectadas pelo ZIKV apresentavam um conjunto de anomalias fetais, não limitada apenas à microcefalia, no qual passou a ser definido como Síndrome Congênita do Zika (SCZ) (DE OLIVEIRA MELO et al., 2016). Segundo Moore e colaboradores (2017), as principais alterações da SCZ, que também são comuns em outras infecções congênicas, são as deficiências cognitivas, sensoriais e motoras. Porém, outras alterações incomuns em infecções congênicas também são observadas na SCZ, que incluem a microcefalia grave com colapso parcial do crânio, córtex cerebral fino com calcificações subcorticais, cicatrização macular e pigmentação mosqueada focal da retina, contraturas congênicas (artrogripose), hipertonia precoce marcante e sintomas de envolvimento extrapiramidal. O reconhecimento do fenótipo dessas alterações permite a diferenciação da SCZ de outras infecções congênicas e, assim, auxiliam no seu diagnóstico e melhor acompanhamento das crianças afetadas (MOORE et al., 2017).



Figura 5: Comparação entre um bebê normal com aquele que apresenta microcefalia ou microcefalia grave. Adaptado de: CDC/NCBDDD (<http://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/microcephaly.html>). Acesso em: 5 de junho de 2016.

A capacidade do ZIKV ser transmitido verticalmente e causar diversos danos aos tecidos alvo, como o cérebro em desenvolvimento e alterando diversas vias do neurodesenvolvimento, é semelhante aos patógenos TORCH, acrônimo para *Toxoplasma gondii*, outros, Rubéola vírus, citomegalovírus e Herpes simplex vírus (LOCKROW; TULLY; SANETO, 2019). Dessa forma, assim como os agentes TORCH, a infecção pelo ZIKV causa diversas alterações de desenvolvimento e as suas manifestações de longo prazo podem não ser aparentes ao nascimento e ser diagnosticadas apenas durante o desenvolvimento da criança. Assim, pode ser que ainda levará um longo período para que todo o espectro de alterações causadas pelo ZIKV seja completamente observado nos indivíduos afetados (COYNE; LAZEAR, 2016).

1.5) Patogênese da Zika

O ZIKV pode ser depositado na derme e epiderme do hospedeiro durante o repasto sanguíneo realizado pelo mosquito vetor infectado. O vírus pode infectar inicialmente fibroblastos da derme, queratinócitos da epiderme e células dendríticas imaturas, conforme descrito por Hamel e colaboradores (2015a), onde foi demonstrada a susceptibilidade destas células a uma amostra do ZIKV isolada de um paciente virêmico na Polinésia Francesa em 2013. A Figura 6 exemplifica, de forma resumida, o processo de entrada do ZIKV na célula hospedeira e sua interação com algumas vias celulares.

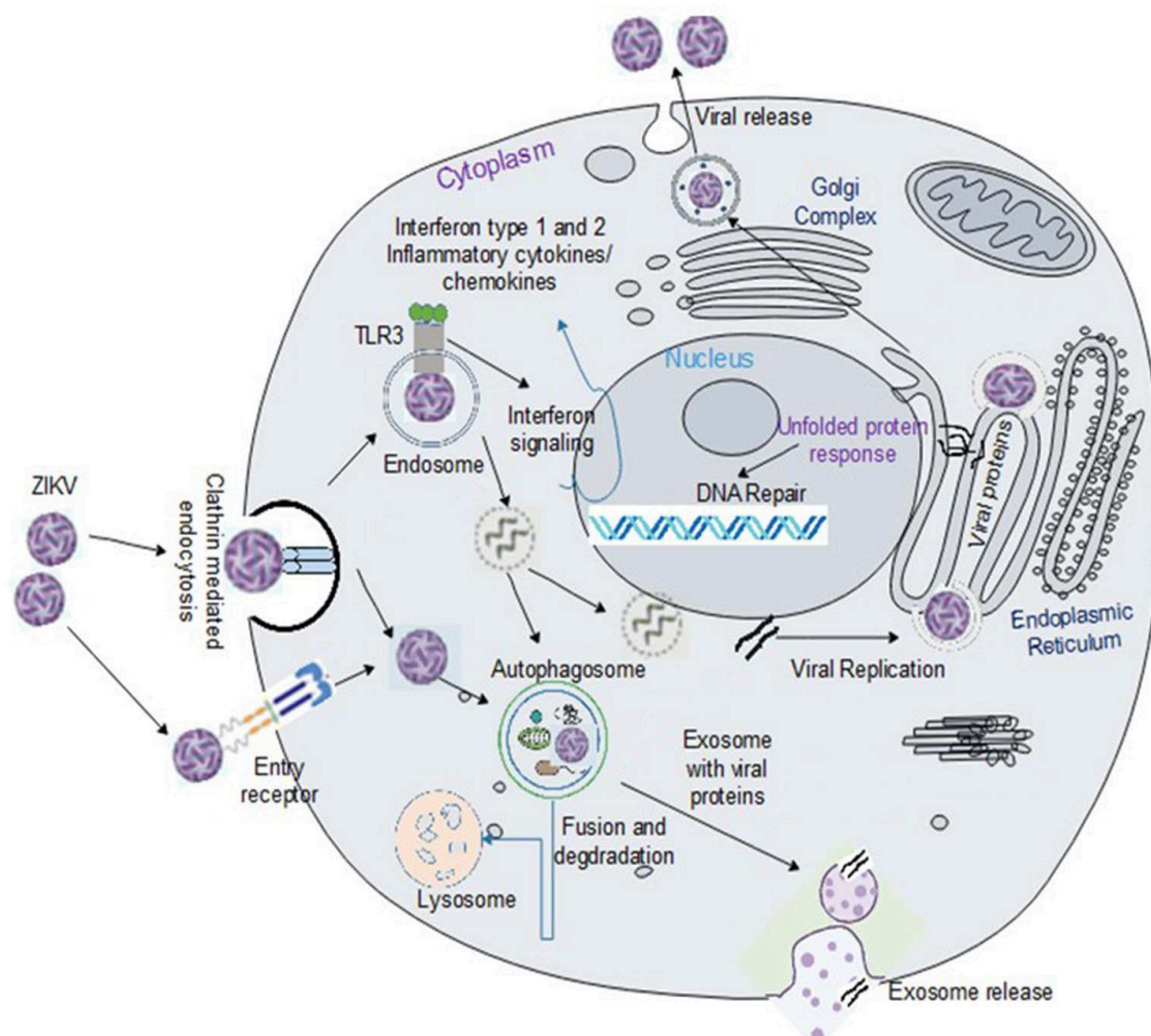


Figura 6: A entrada do ZIKV na célula hospedeira, replicação e interação com vias celulares. Após entrada e replicação do ZIKV na célula hospedeira, o vírus pode ativar as vias de TLR3 e de autofagia, que potencialmente medeiam sua replicação e viabilidade dentro da célula. Ainda, exossomos liberados pela célula infectada podem conter proteínas do ZIKV. O vírus também pode ativar uma via de proteínas não-enoveladas e levar ao reparo de DNA, homeostase celular ou apoptose. Fonte: Ojha e colaboradores (2018).

Semelhante ao que é observada para outros flavivírus, a infecção de fibroblastos pelo ZIKV promove um aumento da expressão de genes de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como o receptor do tipo *toll*-3 (TLR3), o gene induzível por ácido retinoico I (RIG-I) e o gene associado à diferenciação de melanoma 5 (MDA-5), que são capazes de detectar padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs). Essa infecção também promove a expressão de genes associados à resposta imune antiviral, produzindo interferons (IFNs) (IFN- α e IFN- β) e também expressando genes estimulados por IFNs, como 2'-5' oligoadenilato sintetase 2 (OAS2), ISG15 (*Interferon-Stimulated Gene 15*) e MX1 (*MX dynamin like*

GTPase 1), além das quimiocinas CXCL10, CXCL11 e CCL5. Foi demonstrado que a replicação do ZIKV foi inibida por IFNs do tipo I e II, sugerindo o papel dessas citocinas no mecanismo de defesa do hospedeiro. Além disso, a infecção de fibroblastos induziu a formação de autofagossomos, os quais possivelmente contribuem com a multiplicação viral na célula hospedeira (HAMEL et al., 2015b).

Um estudo preliminar realizado com seis pacientes infectados pelo ZIKV no Sudeste Asiático, Polinésia e Brasil demonstrou que durante a fase aguda da doença ocorre uma ativação polifuncional do sistema imune, caracterizada pela produção de diversas citocinas e quimiocinas, como citocinas associadas às respostas Th1 (IL-2), Th2 (IL-4 e IL-13), Th17 (IL-17) e Th9 (IL-9). Os níveis dos ligantes das quimiocinas CCL5 (ligante do receptor CCR5) e de CXCL10 (ligante do receptor CXCR3) estavam elevados em relação a pacientes normais durante as fases aguda e de recuperação, embora a primeira quimiocina mais pronunciadamente na fase aguda e a última em maior concentração na fase de recuperação. Similar à infecção pelo DENV, além de IL-4 e CXCL10, níveis elevados de IL-6, IL-8 e IL-10 foram observados, sendo que o nível de IL-10 também estava aumentado durante a fase de recuperação. Entretanto, em contraste ao observado na dengue, as concentrações de IL-1 β , IL-2, CCL2 e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) não aumentaram na infecção pelo ZIKV. Já os níveis de IFN- γ e TNF, em contraste à dengue, não aumentaram na infecção pelo ZIKV (TAPPE et al., 2016). Barros et al. (2018) também encontraram níveis elevados de CCL5, CXCL10 e IL-9 em indivíduos com infecção aguda pelo ZIKV comparados com doadores saudáveis. Entretanto, em contraste ao estudo de Tappe e colaboradores (2016), os níveis de outros mediadores estavam elevados nos pacientes avaliados, como IFN- γ , IL-7, IL-5 e IL-1ra. Além disso, os níveis elevados de CXCL10 e IL-5 nos pacientes infectados foram correlacionados com exantema e enxaqueca, o aumento de IL-1ra com artralgia e baixos níveis de fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) com febre (BARROS et al., 2018). Semelhante a esses estudos, Lum e colaboradores (2018) também encontraram um aumento nos níveis de CXCL10, IL-1RA e IL-8, além de elevação de CCL2, do fator de crescimento placentário 1 (PIGF-1) e uma redução do número de células CD8+, CD4+ e células T duplo negativas em pacientes sintomáticos na fase virêmica da infecção por ZIKV (LUM et al., 2018).

O ZIKV pode disseminar também para outros órgãos (Figura 7) através da circulação sanguínea/linfática, possivelmente para músculos esqueléticos, miocárdio

(WEINBREN; WILLIAMS, 1958), sistema nervoso central (SNC) e também para o feto, no caso de mulheres grávidas (MLAKAR et al., 2016). Estudos experimentais *in vivo* realizados no período do isolamento da linhagem africana do ZIKV já haviam evidenciado a neurovirulência do vírus, sendo que os camundongos albinos suíços infectados pelo ZIKV mostraram-se susceptíveis à inoculação intracerebral e o vírus não foi recuperado de nenhum outro órgão, senão o cérebro destes animais (DICK, 1952; DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Posteriormente, alterações patológicas em músculos esqueléticos e miocárdio também foram relatadas em camundongos jovens infectados pelo ZIKV (WEINBREN; WILLIAMS, 1958). Além disso, a multiplicação do vírus em astrócitos e neurônios foi evidenciada por análise de microscopia eletrônica de cérebros de camundongos suíços webster infectados por via intracerebral (BELL; FIELD; NARANG, 1971).

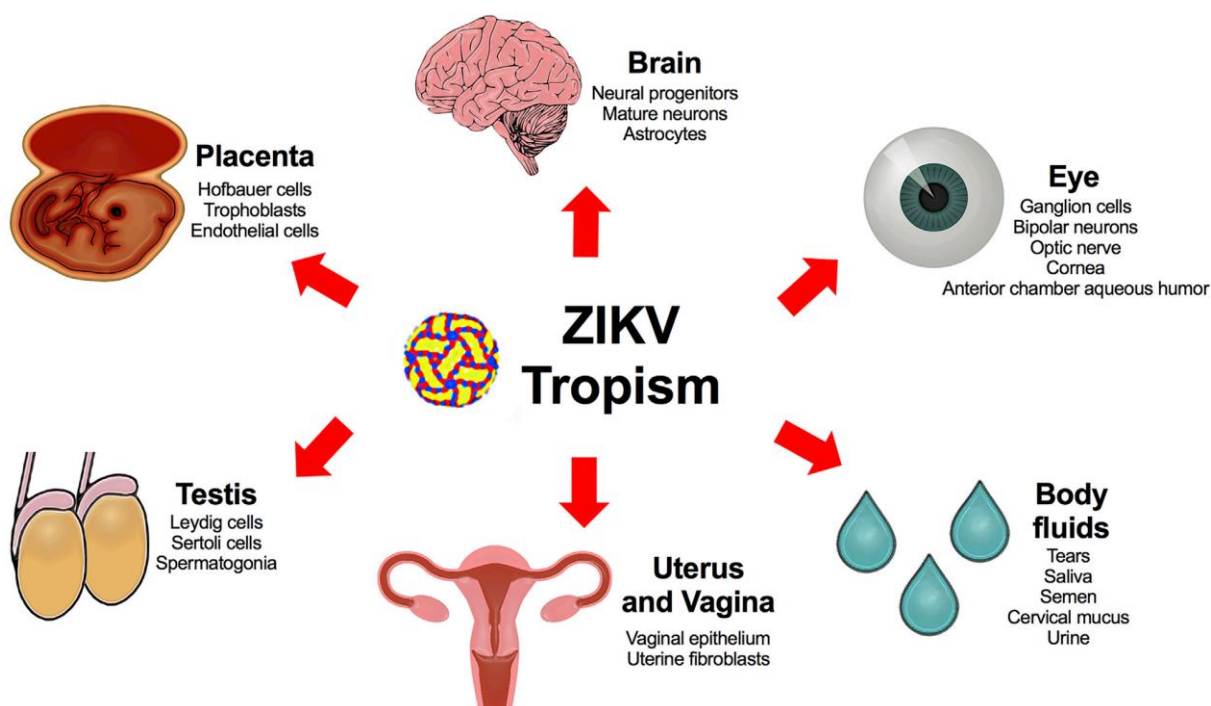


Figura 7: O tropismo do ZIKV para diferentes células e tecidos. O ZIKV já foi detectado em células da placenta, como células de Hofbauer, trofoblastos e endoteliais. No cérebro, o vírus também já foi observado em células progenitoras neurais, neurônios maduros e astrócitos. O ZIKV também infecta tecidos oculares, como córnea, retina, nervo óptico e humor aquoso da câmara anterior. No trato reprodutivo, o ZIKV tem como alvo espermatogônia, células de Sertoli e Leydig, epitélio vaginal e fibroblastos uterinos. O vírus também pode ser detectado em diversos fluidos corporais, como lágrimas, saliva, sêmen, muco cervical, lavado vaginal e urina. Fonte: Miner e Diamond (2017).

Estudos recentes demonstraram que o ZIKV também é capaz de infectar células progenitoras neurais (NPCs) humanas derivadas de células tronco

pluripotentes (DANG et al., 2016; GARCEZ et al., 2016a; LI et al., 2016; TANG et al., 2016). Esse neurotropismo do ZIKV pode ser atribuído à expressão do receptor de proteína tirosina-quinase AXL nestas células. Esse receptor é altamente expresso por células gliais radiais, astrócitos, células endoteliais, micróglia no córtex humano em desenvolvimento e também em células progenitoras de retina em desenvolvimento. Esses dados podem ajudar a explicar os mecanismos causadores tanto da microcefalia, como das lesões oculares associadas à infecção pelo ZIKV (NOWAKOWSKI et al., 2016).

Na busca por potenciais fatores de adesão/internalização viral, receptores AXL e Tyro3, o DC-SIGN e, em menor extensão, o receptor TIM-1 (*T-cell Immunoglobulin and Mucin domain 1*) em células epiteliais humanas foram capazes de promover a adsorção/entrada do ZIKV, demonstrando o envolvimento desses componentes no processo de infecção do ZIKV (HAMEL et al., 2015b). A importância do receptor AXL também foi destacada em outros trabalhos, onde foi importante para a infecção de diversas linhagens celulares endoteliais (LIU et al., 2016; RETALLACK et al., 2016; RICHARD et al., 2017) e também de fibroblastos humanos, sendo essencial para o processo de endocitose e acidificação do endossomo, etapas importantes do ciclo de infecção na célula hospedeira (PERSAUD et al., 2018). O AXL também medeia a infecção pelo ZIKV em micróglia e astrócitos humanos, tanto se ligando indiretamente à partícula viral através da proteína Gas6 e permitindo a entrada do vírus na célula hospedeira, como também inibindo posteriormente a sinalização de IFN tipo I, que é essencial para a regulação da infecção do ZIKV (MEERTENS et al., 2017). Controversamente, foi demonstrado que o AXL promove a infecção do ZIKV em astrócitos humanos primários e linhagens de astrocitoma humano não mediando a entrada do vírus, mas apenas antagonizando a sinalização de IFN tipo I, via proteína supressora da sinalização de citocinas 1 (SOCS1, *Suppressor Of Cytokine Signaling 1*) de maneira dependente do fator de transcrição denominado Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1, *Signal transducer and activator of transcription 1*) e STAT2 (CHEN et al., 2018). Neste sentido, outros trabalhos também demonstraram que a infecção pelo ZIKV ocorre independente da presença do AXL em modelos *in vitro* usando células humanas (RAUSCH et al., 2017; WELLS et al., 2016) e também *in vivo* usando camundongos (HASTINGS et al., 2017; LI et al., 2017; MINER et al., 2016a; WANG et al., 2017). A importância da resposta imune inata via interferons também foi demonstrada em modelo de *Drosophila*, onde a sinalização inflamatória

de NF- κ B ativa a expressão da molécula estimuladora dos genes de interferon (STING *stimulator of interferon genes*), que apresenta atividade antiviral, ajudando a restringir a infecção pelo ZIKV no cérebro de moscas adultas através da autofagia em neurônios (LIU et al., 2018).

Modelos animais foram essenciais para determinar a neuropatogenicidade do ZIKV após a suspeita inicial de que a infecção congênita pelo vírus estava associada à microcefalia em 2015/2016. Inicialmente, modelos murinos demonstraram o papel crucial dos interferons no controle da infecção pelo ZIKV (ALIOTA et al., 2016; DOWALL et al., 2016; LAZEAR et al., 2016; ROSSI et al., 2016). Ainda, diversos modelos murinos reportaram a capacidade de causar sérios danos congênitos pelo ZIKV, incluindo danos cerebrais e microcefalia (CUGOLA et al., 2016; LI et al., 2016; MINER et al., 2016b; WU et al., 2016; YOCKEY et al., 2016). Subsequentemente, um alto número de trabalhos utilizando modelos animais de infecção pelo ZIKV foram e continuam sendo publicados, contribuindo para o conhecimento não apenas da patogênese e efeitos do ZIKV sobre a gravidez, mas também da transmissão sexual, determinantes virais e desenvolvimento de vacinas e terapêuticos (BRADLEY; NAGAMINE, 2017; DONG; LIANG, 2018). Nesse sentido, nosso grupo desenvolveu e teve participação direta em trabalhos usando modelos animais imunodeficientes (A129) a fim de investigar diversos aspectos da infecção pelo ZIKV. Costa e colaboradores (2017) descreveram um mecanismo de morte neuronal induzido pelo ZIKV via aumento de excitotoxicidade mediada pela superestimulação de receptores de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR). O tratamento com bloqueadores de NMDAR, como a memantina, um medicamento aprovado por agências reguladoras internacionais para o tratamento de Alzheimer, foi capaz de prevenir a morte neuronal sem afetar a capacidade de replicação de replicação do ZIKV nas células hospedeiras (COSTA et al., 2017; OLMO et al., 2017). Além disso, um modelo experimental em camundongos do tipo selvagem foi desenvolvido com o objetivo de fornecer mimetizar melhor as alterações humanas causadas pelo ZIKV do que modelos utilizando camundongos imunodeficientes ou por meio de injeção intracerebral do vírus. Nesse modelo, com a infecção sistêmica materna pelo ZIKV no dia embrionário 5, equivalente à segunda semana de gestação em humanos, permitiu a observação de alterações no neurodesenvolvimento refletidos na morfologia cerebral, além má-formações graves e atraso de desenvolvimento de embriões em diferentes períodos avaliados (XAVIER-NETO et al., 2017). Assim, o modelo apresentado nesse trabalho

foi desenvolvido com base nesses trabalhos, onde foi demonstrado que a infecção congênita pelo ZIKV em camundongos imunocompetentes causa diversas alterações desde a fêmea grávida e seus embriões, como também em vários tecidos da prole adulta, não limitados apenas ao sistema nervoso central (CAMARGOS et al., 2019).

Além dos fatores relacionados à patogenicidade viral, outra relação do ZIKV com as complicações graves da doença pode estar diretamente relacionada ao sistema imune do hospedeiro. Estas complicações podem ser resultantes de um processo inflamatório exacerbado na placenta, alterando a produção de peptídeos e fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento do feto (MOR, 2016). Em camundongos, já foi demonstrado que danos placentários contribuem com o desenvolvimento anormal dos embriões (PEREZ-GARCIA et al., 2018). Nesse sentido, a infecção pelo ZIKV em camundongos imunocompetentes pode causar efeitos adversos no feto, mesmo na ausência de transmissão vertical, através de processo patológico da placenta (SZABA et al., 2018). Além disso, há um grande número de peptídeos homólogos entre a poliproteína do ZIKV e proteínas humanas associadas à microcefalia, calcificações no cérebro e SGB quando elas são alteradas. Assim, a exposição ao ZIKV durante a gestação pode desenvolver uma condição autoimune, resultando em respostas antivirais com reações cruzadas com proteínas humanas que, se atacadas, podem contribuir com o desenvolvimento de complicações neurológicas associadas à infecção pelo ZIKV (LUCCHESI; KANDUC, 2016).

Uma característica relevante das epidemias mais recentes do ZIKV, quando os casos mais graves da doença foram observados, é que elas ocorreram em regiões com hiperendemicidade dos DENV (Figura 8). Em regiões com grande presença do DENV, onde circulam diferentes sorotipos do vírus, é esperado que a maioria da população tivesse sido infectada por um ou mais destes sorotipos (LAZEAR; DIAMOND, 2016).

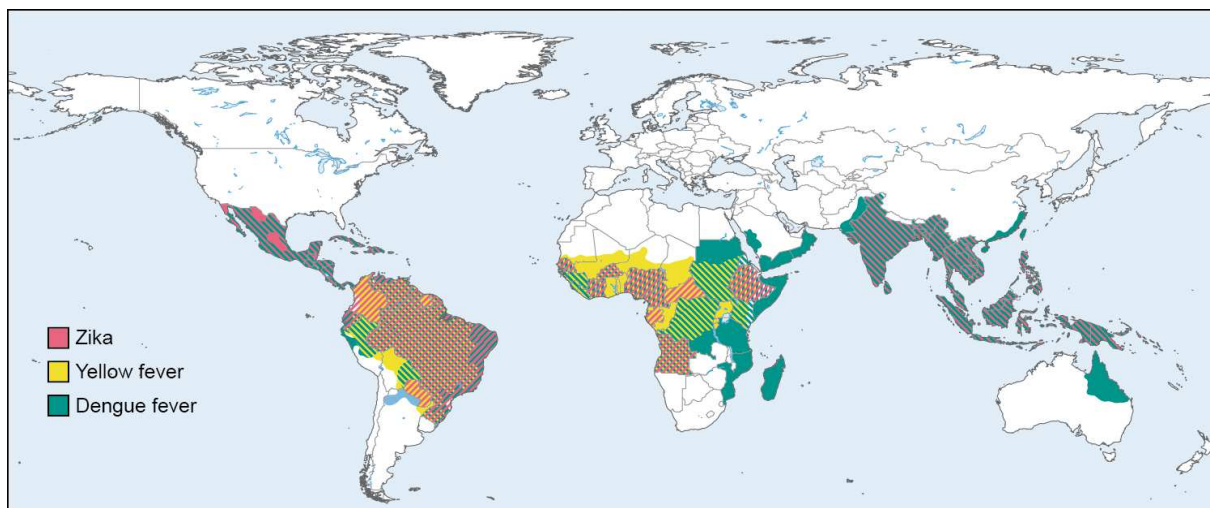


Figura 8: Distribuição global dos principais flavivírus. A distribuição global do Zika virus (rosa), Vírus da Febre Amarela (amarelo) e Dengue virus (verde) estão mostradas na figura, onde as áreas onde há co-circulação desses flavivírus são demonstradas pelas cores sobrepostas. Adaptado de: Pierson e Diamond (2020).

Uma particularidade marcante na patogênese da dengue é que após a infecção primária por um sorotipo do DENV, o indivíduo desenvolve imunidade protetora permanente contra o sorotipo infectante e proteção cruzada temporária contra os demais sorotipos (GUZMAN; HARRIS, 2015). Porém, durante uma infecção heteróloga, os anticorpos produzidos contra o primeiro sorotipo infectante podem desempenhar o papel inverso, contribuindo para o aumento da infecção, via um fenômeno denominado “Intensificação da infecção dependente de anticorpos” (ADE, *antibody-dependent enhancement*). Neste caso, esses anticorpos não-neutralizantes, adquiridos previamente (durante a infecção primária) ou passivamente (crianças nascidas de mães imunes à dengue), podem formar imunocomplexos com o vírus, facilitando a infecção de células que expressam os receptores de imunoglobulinas (FcR) do tipo gama (FcγR), via interação com a porção Fc dos anticorpos. Com esta interação, há um aumento no número de células infectadas que resulta em uma elevada carga viral e conseqüentemente maior resposta inflamatória em comparação a indivíduos infectados na ausência desses anticorpos (KATZELNICK et al., 2017). Além disso, também é sabido que a infecção mediada por anticorpos é capaz de interferir na resposta antiviral dessas células após a infecção, em um fenômeno conhecido como ADE intrínseco (ADEi) (CHAREONSIRISUTHIGUL; KALAYANAROOJ; UBOL, 2007; UBOL et al., 2010). Neste caso, além do aumento no número de células infectadas, essas células respondem sinalizando de maneira diferente após a ligação do complexo DENV-anticorpo nos receptores FcγR

(BOONNAK et al., 2013), aumentando a produção de mediadores anti-inflamatórios tais como a citocina IL-10 e levando a ativação de uma família de proteínas denominadas SOCS, que por sua vez atuam interferindo com a resposta antiviral inata da célula infectada, via supressão da produção de IFNs do tipo I e ISGs (CHAREONSIRISUTHIGUL; KALAYANAROOJ; UBOL, 2007; COSTA et al., 2014; UBOL et al., 2010). De acordo, também foi demonstrado que o reconhecimento destes imunocomplexos (DENV-anticorpo) podem regular positivamente a expressão dos genes SARM e TANK, conhecidamente reguladores negativos da via de ativação de NF- κ B, resultando em aumentada replicação viral na célula infectada (MODHIRAN; KALAYANAROOJ; UBOL, 2010).

Uma resposta imune/inflamatória efetiva é o resultado do balanço da ativação entre sinais positivos e negativos dentro da célula hospedeira, que por sua vez impactam diretamente no resultado da montagem final das respostas contra aquele patógeno. A modulação deste sistema binário ocorre através da produção e ação de mediadores (e.g.: citocinas), ativação de vias de sinalização intracelular e contato direto célula-célula. A família dos FcRs é um exemplo clássico de como a ativação simultânea destes receptores em uma única célula pode levar a sinais ativadores ou inibitórios, resultando em diferentes graus de ativação e respostas (NIMMERJAHN, 2016). Uma grande variedade de tipos celulares como neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos, células dendríticas e mastócitos expressam diferentes FcRs que se ligam à diferentes classes de imunoglobulinas. Por exemplo, os Fc α R se ligam à IgA, Fc γ R se ligam à IgG, Fc δ R se ligam à IgD, Fc ϵ R se ligam à IgE e Fc μ R se ligam à IgM, além de outros receptores como FcR *homolog* (FcRH) e FcR neonatal (FcRn) (OKUN; MATTSON; ARUMUGAM, 2010; ROOPENIAN; AKILESH, 2007). Em camundongos, diversos tipos celulares expressam concomitantemente a classe dos Fc γ Rs que apresentam receptores com domínios ativadores (Fc γ RI, Fc γ RIII e Fc γ RIV), que sinalizam via motivo de ativação de imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM, *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), e inibitórios (Fc γ RIIb) que sinalizam via ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), sendo que o balanço dessa sinalização é o que regula a resposta final da célula (OKUN; MATTSON; ARUMUGAM, 2010). O envolvimento dos receptores Fc durante patologias do SNC tem sido cada vez mais sugerido (OKUN; MATTSON; ARUMUGAM, 2010). De fato, um ou mais FcRs são expressos em diversos tipos celulares do SNC, como em células dos tecidos periventriculares, na micrógliia, em

oligodendrócitos, em astrócitos e neurônios (NAKAHARA et al., 2003; SONG et al., 2004). Mais especificamente, células microgлияis expressam todas as classes de FcRs; os astrócitos expressam alguns FcRs, como FcγRI; os oligodendrócitos expressam o FcγR, FcαR e FcμR; e por fim os neurônios, nos quais expressam os FcγRI, FcγRII, FcγRIII e FcεRI. Ativação excessiva dos FcRs em condições neurológicas neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a Esclerose Múltipla e o Acidente Vascular Cerebral já foram reportadas (ABDUL-MAJID et al., 2002; CAO; STANDAERT; HARMS, 2012; FERNANDEZ-VIZARRA et al., 2012; KOMINE-KOBAYASHI et al., 2004; OKUN; MATTSON; ARUMUGAM, 2010). Portanto, é necessário que as funções dos FcRs sejam investigadas em condições normais e patológicas, pois a ativação anormal desses receptores em células neurais pode contribuir para a patogênese de importantes condições neuropatológicas (OKUN; MATTSON; ARUMUGAM, 2010).

Desta forma, considerando: (A) a similaridade genética entre o DENV e ZIKV, que é de 54-59% comparando a homologia da proteína E viral (DEJNIRATTISAI et al., 2016), incluindo epítomos-alvo da produção de anticorpos com reatividade cruzada (GRIFONI et al., 2017); (B) a hiperendemicidade destes vírus no território Brasileiro (PIERSON; DIAMOND, 2020); (C) a alta reatividade cruzada observada em testes sorológicos (RATHORE; ST. JOHN, 2020); e (D) a ocorrência de casos graves de infecção pelo ZIKV (SCZ e SGB) em regiões com grande circulação do DENV, a possibilidade da ocorrência dos fenômenos de ADE e ADEi entre DENV e ZIKV (Figura 9) deve ser mais bem investigada (LAZEAR; DIAMOND, 2016). Diversos trabalhos reportaram a reatividade cruzada entre ZIKV e outros flavivírus. Um estudo inicial demonstrou o efeito do ADE do ZIKV *in vitro* utilizando células de camundongos na presença de anticorpos não neutralizantes obtidos de amostras de fluido ascítico homólogo de camundongos e também anticorpos obtidos a partir de fluidos heterólogos de outros flavivírus (FAGBAMI et al., 1987). Recentemente, esse efeito também foi observado *in vitro* em células de origem humana (CASTANHA et al., 2017; DEJNIRATTISAI et al., 2016; HERMANNNS et al., 2018; HUESTON; RAMIREZ; MAHALINGAM, 2017; LI et al., 2018; PAUL et al., 2016; ROGERS et al., 2017; ZIMMERMAN et al., 2018), *in vivo* em modelos murinos (BARDINA et al., 2017; BROWN et al., 2019; RATHORE et al., 2019) e em humanos (WANG et al., 2020). Estes achados sugerem que anticorpos subneutralizantes anti-dengue e/ou contra outros flavivírus apresentam o potencial de exacerbar a infecção pelo ZIKV. Por outro

lado, outros autores demonstraram dados que sugerem a falta de reatividade cruzada ou até mesmo uma reação cruzada associada à proteção em modelos experimentais e achados clínico-epidemiológicos (BREITBACH et al., 2019; HALAI et al., 2017; MCCRACKEN et al., 2017; PANTOJA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018; RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2019; TERZIAN et al., 2017; WEN et al., 2017; ZHOU et al., 2020). Portanto, considerando a co-circulação de ZIKV, DENV e outros flavivírus em muitas áreas endêmicas, torna-se essencial a continuação da exploração das consequências da infecção pelo ZIKV após pré-exposição à outros flavivírus (WILDER-SMITH et al., 2017).

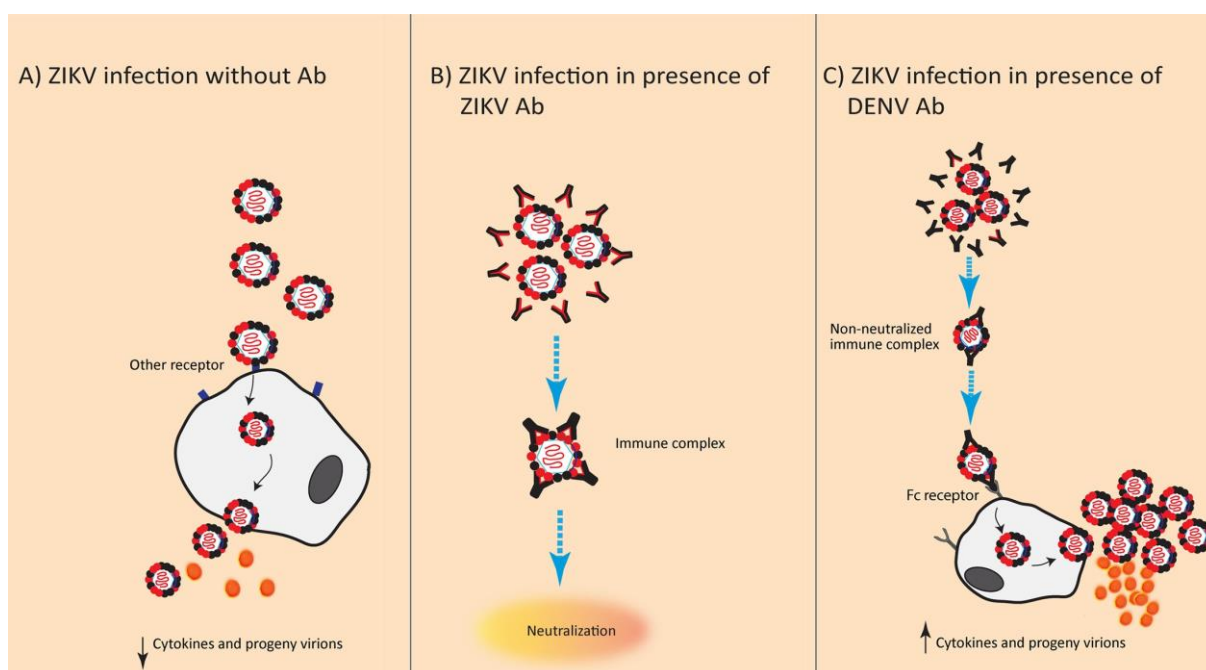


Figura 9: Mecanismo proposto para o aumento dependente de anticorpos (ADE) da infecção pelo ZIKV mediada por anticorpos anti-DENV com reatividade cruzada. Em comparação com a infecção primária pelo ZIKV em indivíduos *naïve*, que ocorre por meio de outros receptores e leva a uma certa taxa de produção de vírus e citocinas (A), na infecção secundária na presença de anticorpos neutralizantes contra o ZIKV ocorre uma neutralização efetiva do vírus infectante (B). Porém, na presença de anticorpos contra infecção primária por DENV, os anticorpos podem reagir de forma cruzada, não neutralizando o vírus, permitindo a entrada do complexo vírus-anticorpo em células expressando receptores Fc, levando a uma maior carga viral e elevada produção de citocinas anti e/ou pró-inflamatórias. Fonte: Langerak e colaboradores (2019).

O ZIKV tem a capacidade de atravessar a barreira placentária e infectar o feto, embora o mecanismo envolvido neste processo ainda não é completamente conhecido. Diversos mecanismos já foram propostos, sendo um deles é que o vírus seria levado por meio da circulação materna até a porção maternal da placenta (ROMBI et al., 2020; TABATA et al., 2018). Bayer e colaboradores (BAYER et al.,

2016) sugerem que é improvável que o vírus atravessasse a placenta por infecção direta dos sinciciotrofoblastos placentários nos últimos estágios da gestação devido à produção constitutiva de IFN tipo III, principalmente IFN λ 1, que possui potente atividade antiviral. Desta forma, o ZIKV deve escapar das vias de sinalização antiviral de IFN tipo III e/ou atravessar essas células por uma via ainda desconhecida para alcançar o compartimento fetal (BAYER et al., 2016). Os autores também hipotetizaram que a produção e/ou responsividade de IFN λ s podem variar de acordo com o tempo de gestação ou tipo celular investigado e, por isso, trofoblastos do primeiro trimestre do período gestacional podem ser mais permissivos a infecção pelo ZIKV que nos períodos mais tardios da gestação (BAYER et al., 2016). Segundo Nowakowski e colaboradores (2016), após atravessar a barreira placentária, o ZIKV infecta inicialmente células gliais radiais, uma vez que apresentam maior expressão do receptor AXL, seja através da corrente sanguínea, devido ao contato frequente destas células com os vasos sanguíneos, ou via líquido cefalorraquidiano, devido ao seu contato com a extremidade apical dessas células. Assim, destruindo as células radiais gliais, que geram todos os neurônios corticais, o ZIKV pode produzir microcefalia no feto em desenvolvimento (NOWAKOWSKI et al., 2016).

Interessantemente, em um estudo envolvendo a infecção congênita pelo citomegalovírus (CMV), os autores demonstraram que anticorpos maternos podem intensificar ou prevenir a infecção de sinciciotrofoblastos da placenta via subversão do processo de transcitose mediado pelo FcRn (MAIDJI et al., 2006). Nesse sentido, recentemente foi demonstrado que o ZIKV é capaz de infectar células de Hofbauer (macrófagos placentários) e, em menor extensão, citotrofoblastos, sugerindo uma possível via pela qual o ZIKV utilize para cruzar a barreira placentária (QUICKE et al., 2016). Neste estudo os autores discutem que uma das possibilidades do vírus ter acesso ao feto seria através de anticorpos com reatividade cruzada da mãe, nos quais estariam se ligando ao ZIKV e favorecendo o tráfico deste imunocomplexo através da placenta via ativação do FcRn nestes macrófagos, resultando em maior replicação viral nestas células (QUICKE et al., 2016). Diferentes classes de Fc γ Rs são expressos pela placenta humana, sendo que além do FcRn em sinciciotrofoblastos e células endoteliais, também já foi detectada a expressão de Fc γ RI em células de Hofbauer, Fc γ RII em células de Hofbauer e endotélio fetal, Fc γ RIII em células de Hofbauer e trofoblastos (ROOPENIAN; AKILESH, 2007; SAJI et al., 1999). Entretanto, em camundongos, apenas um gene Fc γ RII é encontrado, embora tenha sido

demonstrado que um de seus dois produtos gênicos (FcγRIIb2) seja capaz de mediar a rápida endocitose e transcitose de IgG através de vesículas revestidas por clatrina (LYDEN et al., 2001). De fato, Rathore e colaboradores (2019) demonstraram que anticorpos específicos contra DENV em camundongos imunocompetentes fêmeas grávidas podem promover o aumento da transmissão vertical do ZIKV, causando uma síndrome semelhante à microcefalia, em um processo dependente pelo FcRn. Similarmente, Hermanns e colaboradores (HERMANNNS et al., 2018) e também Zimmerman e colaboradores (ZIMMERMAN et al., 2018) evidenciaram que explantes de placenta humana apresentam aumento da infecção pelo ZIKV quando anticorpos cross-reativos anti-DENV estão presentes. Desta forma, considerando a expressão FcγRs por diferentes células humanas, incluindo da placenta, e a observação do efeito de ADE de ZIKV em algumas dessas células, o potencial de intensificação da infecção ZIKV deve ser melhor investigado.

1.6) Alterações do neurodesenvolvimento induzidas pelo ZIKV

Além das alterações neuropatológicas diretamente associadas ao ZIKV, estudos epidemiológicos e em modelos animais indicam que a inflamação materna durante a gestação, devido à infecção ou outros insultos que estimule o sistema imune materno, atuem como um fator de risco de desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas na prole (ESTES; MCALLISTER, 2016; KNUESESEL et al., 2014). De fato, a primeira evidência dessa associação causal surgiu há mais de um século, com o trabalho de Karl Menninger, em 1919 (MENNINGER, 1919). A partir de então, diversos estudos epidemiológicos demonstraram o aumento do risco de se desenvolver, por exemplo, esquizofrenia após exposição pré-natal a uma grande variedade de patógenos, tais como rubéola (BROWN et al., 2001), poliomielite (SUVISAARI et al., 1999), herpes simplex (BUKA et al., 2001) e influenza (TAKEI et al., 1996). Além da associação com a esquizofrenia, outros trabalhos demonstraram uma possível relação entre a infecção pré-natal e outros distúrbios psiquiátricos, tais como o autismo (CHOI et al., 2016), depressão e ansiedade (ENAYATI et al., 2012), epilepsia e doenças neurodegenerativas (KNUESESEL et al., 2014).

Como já foi estabelecido o potencial patogênico do ZIKV no desenvolvimento da microcefalia, é possível que o mesmo possa induzir outras alterações neuropsiquiátricas ainda não reportadas. De forma geral, o fenótipo da doença

neuroológica resultante da ativação imune pré-natal depende não apenas da sua intensidade, tipo e tempo da gestação em que essa ativação imune acontece, mas também da interação com outros fatores ambientais e/ou predisposição genética (KNUESEL et al., 2014). Dessa forma, esses fatores imunes e ambientais podem contribuir sinergicamente na indução de alterações neurológicas nos indivíduos afetados (MEYER, 2014). Ou seja, infecções congênitas, pelo ZIKV por exemplo, podem constituir um insulto pré-natal que torna a prole mais susceptível aos efeitos patológicos de um segundo insulto no período pós-natal, como estresse ou infecção por outros patógenos, culminando no desenvolvimento de alterações neuropatológicas mais graves na idade adulta (GIOVANOLI et al., 2013). Então, como os mecanismos associados às alterações tardias da infecção pelo ZIKV em crianças afetadas permanecem pouco conhecidos, não apenas alterações causadas pelo ZIKV em si, mas a potencial ativação imune materna (AIM) causada por esta infecção também pode contribuir para outras consequências negativas a longo prazo após a infecção congênita pelo ZIKV (ESTES; MCALLISTER, 2016). Além disso, o potencial de ADE da infecção pelo ZIKV por sua reatividade imunológica cruzada pode também intensificar a AIM durante a gestação, logo, agravando as consequências adversas fetais causadas pelo ZIKV.

Alguns estudos clínicos já mostraram que crianças nascidas de mães infectadas pelo ZIKV e que não desenvolveram microcefalia durante a gestação apresentaram diferentes alterações neurológicas dias, meses ou até um ano após o nascimento (ARAGAO et al., 2017; MULKEY et al., 2018). Em relação ao neurodesenvolvimento, um estudo de Faiçal e colaboradores (2019) com crianças normocefálicas que foram expostas ao ZIKV durante a gestação reportou que numa coorte de 29 crianças, 10 destas apresentaram um atraso no desenvolvimento motor, cognitivo ou de linguagem. Semelhantemente, Nielsen-Saines e colaboradores (2019) avaliaram crianças de 7 a 32 meses após o nascimento de mães com infecção pelo ZIKV confirmada por PCR. Embora apenas 3,7% das crianças tenham desenvolvido microcefalia, em média 34% (40% pela avaliação de Bayley-III e 28,7% por questionários de neurodesenvolvimento e avaliação de HINE) das crianças de todo o estudo apresentaram neurodesenvolvimento reduzido e/ou alterações oculares ou auditivas. Ainda, três crianças (2,1%) que eram saudáveis nos dois primeiros anos de vida desenvolveram transtorno do espectro autista (TEA). Dessa forma, como as alterações congênitas resultantes da infecção materna pelo ZIKV foram reconhecidas

recentemente, mais estudos se fazem necessários para avaliar se outros problemas podem afetar as crianças expostas ao vírus no futuro (NIELSEN-SAINES et al., 2019).

Desta forma, é possível que a microcefalia após a infecção congênita pelo ZIKV seja apenas a “ponta do *iceberg*”, sendo que outras consequências adversas a longo prazo podem ser causadas pela exposição materna ao vírus (ESTES; MCALLISTER, 2016). Não obstante, uma vez que a co-circulação do ZIKV e outros flavivírus pode levar a sua reatividade cruzada e potencialmente ADE da infecção pelo ZIKV, a infecção intensificada em mulheres grávidas pode também intensificar a AIM durante a gestação e, logo, agravando as consequências adversas fetais causadas pelo ZIKV. Assim, torna-se necessária a maior caracterização do potencial patogênico do ZIKV na alteração do neurodesenvolvimento de fetos nascidos de mães infectadas e o estudo das consequências da infecção congênita até a fase adulta.

Nesse contexto, uma etapa essencial para a compreensão dos mecanismos patogênicos associados à infecção pelo ZIKV, e o seu possível potencial teratogênico, passa pelo desenvolvimento de modelos experimentais que permitam o entendimento da interação ZIKV-hospedeiro, a fim de elucidar os mecanismos associados à proteção e/ou exacerbação da doença durante a infecção e permitir a identificação de potenciais alvos terapêuticos e os testes dos mesmos em tais modelos experimentais.

1.7) Estratégias terapêuticas contra a infecção pelo ZIKV

A infecção pelo ZIKV é capaz de causar um diferente espectro de consequências patológicas, seja uma doença febril leve a moderada, como complicações neurológicas em adultos e fetos nascidos de mães infectadas durante a gravidez. Dessa forma, diferentes estratégias terapêuticas podem ser aplicadas neste contexto, como medicamentos capazes de controlar os sintomas causados pela infecção ou o uso de drogas com atividade antiviral (JACKMAN et al., 2018).

Considerando a capacidade de infecção de células do sistema nervoso central pelo ZIKV, drogas neuroprotetoras vem sendo testadas como tratamento indireto dessa infecção. A memantina, por exemplo, é um inibidor de NMDAR que já foi testada com o objetivo de prevenir a neurodegeneração causada pelo ZIKV em modelos *in vitro* e *in vivo* (COSTA et al., 2017; OLMO et al., 2017). Outro composto já testado em camundongos é o infliximab, um anticorpo anti-TNF que possui atividade anti-inflamatória. No estudo desenvolvido por Souza e colaboradores (2018) foi

demonstrado que o infliximab foi capaz de prevenir algumas consequências de longo prazo induzidas pela infecção do ZIKV em camundongos Suíços. Além desse composto, outros vêm sendo testados sob a proposta de reposicionamento de fármacos, que possui a vantagem de não precisar passar por todas as etapas do desenvolvimento pré-clínico que um novo medicamento normalmente passaria (SOUZA et al., 2019). No entanto, o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas ainda é necessário para a prevenção ou tratamento de pacientes em potenciais novas epidemias pelo ZIKV.

Uma classe de moléculas que vem sendo investigada recentemente é a dos peptídeos célula-penetrantes, que são substâncias capazes de atravessar, por exemplo, a barreira hematoencefálica (BHE) para exercer sua atividade no sistema nervoso central sem causar dano à essa estrutura de proteção (GRÄSLUND et al., 2011). A partir de estudos com o peptídeo α -helical (AH) da proteína NS5 do Vírus da Hepatite C (HCV – *hepatitis C virus*), foi descoberta a capacidade desse peptídeo induzir a lise de vesículas lipídicas, incluindo partículas virais, inibindo assim a infecção pelo HCV (CHO et al., 2009). O AH adsorve às vesículas e promove a desestabilização na sua camada, causando a lise por ruptura da vesícula, transformando-a em uma bicamada planar (CHO et al., 2007). Por isso, essa estratégia foi chamada de LEAD, do inglês “*lipid envelope antiviral disruption*”, que tem como alvo a característica comum do ZIKV e outros arbovírus de apresentarem um revestimento de envelope lipídico (JACKMAN et al., 2018).

A partir do peptídeo AH, outro composto similar foi desenvolvido pela incorporação de aminoácidos dextrogiros (AH-D) para reduzir sua degradação proteolítica e testado em modelos *in vitro* e *in vivo* a fim de avaliar sua atividade antiviral contra diversos arbovírus (BADANI; GARRY; WIMLEY, 2014; JACKMAN et al., 2018). Com relação ao ZIKV, a eficácia terapêutica do peptídeo AH-D foi avaliada em um modelo de infecção letal em camundongos imunodeficientes A129 (IFN- α/β R^{-/-}) que apresentam infecção sistêmica e cerebral. O tratamento foi capaz de proteger os animais da mortalidade e reduzir outros parâmetros avaliados, como carga viral sistêmica, neuroinflamação e dano cerebral. A carga viral no cérebro também foi reduzida, assim como o dano à BHE causado pela infecção viral (JACKMAN et al., 2018). Portanto, considerando a promissora atividade antiviral do peptídeo AH-D contra o ZIKV e outros arbovírus, a continuação da investigação do potencial

terapêutico do peptídeo AH-D e sua validação em outros modelos experimentais que mimetizam melhor a doença vista em humanos é essencial.

2. JUSTIFICATIVA

O Zika virus é um arbovírus transmitido principalmente por vetores do gênero *Aedes* e que recentemente passou a representar grande relevância médica em regiões onde o vírus está presente. O Zika virus está associado com a ocorrência de complicações neurológicas em indivíduos adultos, a Síndrome de Guillain-Barré, e também em crianças nascidas de mães infectadas durante o período gestacional, causando diversas alterações patológicas denominadas Síndrome Congênita do Zika. Embora a relação entre essas complicações e a infecção pelo Zika virus vem sendo demonstrada por evidências clínicas e modelos experimentais, as consequências a longo prazo dessa infecção, assim como os fatores ambientais envolvidos nessas respostas, ainda permanecem por ser melhor investigadas. Além disso, dada a associação de infecções durante a gravidez com o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas, a infecção pré-natal pelo Zika virus pode apresentar consequências ainda piores do que são conhecidas atualmente.

O Zika virus recebeu atenção mundial apenas recentemente, quando foram observados casos graves associados à infecção pelo vírus nas epidemias ocorridas em regiões do Pacífico Sul e Américas. Essas epidemias ocorreram em áreas de grande circulação de outros arbovírus, como os Dengue virus, sendo inclusive detectadas co-infecções de ambos os vírus. Casos graves de dengue geralmente são associados ao fenômeno de aumento da infecção dependente de anticorpos, processo no qual anticorpos produzidos durante a infecção primária por um sorotipo dos Dengue virus promovem uma intensificação da infecção pelo novo sorotipo durante uma infecção secundária. Apesar deste fenômeno ter sido estudado extensivamente com os diferentes sorotipos dos Dengue virus, o papel destes anticorpos anti-dengue na potencialização da infecção pelo Zika virus é controverso, com estudos indicando a ocorrência deste fenômeno, enquanto outros demonstram que isto não ocorre. Caso confirmada, essa hipótese pode ter sérias implicações tanto na gravidade da manifestação da doença, como também no desenvolvimento de terapias específicas e na efetividade de futuras vacinas contra o Dengue virus e Zika virus. Portanto, novos estudos são necessários para avaliar essa hipótese *in vivo*, observando não apenas o efeito deste fenômeno durante a potencialização da infecção intra-útero, mas também a médio e longo prazo ao longo do desenvolvimento destes animais.

3. OBJETIVOS

3.1) Objetivo geral

Avaliar as alterações causadas pela infecção pelo Zika virus, na presença ou ausência de anticorpos pan-flavivirus, durante os períodos pré e pós-natal da prole de camundongos imunocompetentes e os mecanismos imunoinflamatórios associados à resposta do hospedeiro.

3.2) Objetivos específicos

- I. Avaliar as concentrações de mediadores pró-inflamatórios, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, TNF e IFN- γ , no baço e plasma de camundongos fêmeas grávidas após infecção pelo ZIKV;
- II. Avaliar a viabilidade fetal e carga viral do ZIKV na placenta e no cérebro de embriões derivados de camundongos fêmeas infectadas durante a gestação e comparar esses parâmetros na ausência ou presença prévia de anticorpos pan-flavivírus;
- III. Avaliar a produção de mediadores inflamatórios, CCL2, CCL5, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, TGF- β , IFN- α , IFN- β e IFN- γ , associados à infecção pelo ZIKV na placenta e no cérebro dos embriões para comparar o perfil da produção destes mediadores após infecção pelo ZIKV na presença ou ausência de anticorpos pan-flavivírus;
- IV. Avaliar as possíveis alterações de neurodesenvolvimento, oculares, testiculares e ósseas induzidas pela infecção materna do ZIKV, na presença e ausência dos anticorpos pan-flavivírus, durante o período pós-natal da prole;
- V. Avaliar se o tratamento com o peptídeo antiviral AH-D é capaz de prevenir as alterações embrionárias causadas pela infecção pelo ZIKV durante a gestação na presença de anticorpos pan-flavivírus;
- VI. Avaliar possíveis alterações neuropatológicas latentes na prole previamente susceptível devido à ativação imune materna causada pela infecção congênita do ZIKV (primeiro insulto), a serem reveladas pelo estresse imprevisível durante o período pré-púbere (segundo insulto);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) Ética em Experimentação Animal

Este trabalho foi conduzido de acordo com a Regulação Ética em Experimentação Animal segundo a Lei Federal 11.794, de outubro de 2008. Todos os experimentos foram primeiramente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), sob protocolos de número 217/2017 e 194/2019 (Anexo 3). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia de cetamina/xilazina e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento animal. Os estudos com ZIKV foram conduzidos no laboratório de Imunofarmacologia, sob nível de biossegurança nível 2, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.2) Vírus, cultura celular e anticorpos

Neste trabalho foi utilizado o isolado clínico contemporâneo do Zika virus (HS-2015-BA-01; disponível em ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX520666) obtido a partir do soro de um paciente infectado durante o surto da infecção em 2015 na cidade de Salvador/BA, no qual foi gentilmente cedido pela Profa. Silvia Sardi da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

O vírus foi propagado em células de *Aedes albopictus* C6/36 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) a 28 °C na presença de meio L-15 suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, a 37 °C e 5% CO₂ por 7 dias (COSTA et al., 2017). O sobrenadante obtido das culturas infectadas foi centrifugado a 2000 rpm por 10 min para retirada dos debris celulares.

O hibridoma do anticorpo monoclonal 4G2 (hibridoma D1.4G2.4.15) foi adquirido da *American Type Culture Collection* (ATCC; <https://www.atcc.org/Products/All/HB-112.aspx>), cultivado em meio livre de soro e obtido através de precipitação por sulfato de amônio. Após diálise em tampão salina fosfato (PBS –*phosphate-buffered saline*; 0,4 M NaCl e 10 mM de NaPO₄), os anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade por proteína A/G (PAGE; THORPE, 1998).

Anticorpos anti-caspase-3 (Abcam 13585), anti-Iba1/AIF1 (PA5-21274), Fluoro-Jade C® (Merk Millipore AG325), anti-NeuN (Abcam 104225), anti-S100B (Abcam 41548) foram usados durante os experimentos de imuno-histoquímica ou imunofluorescência.

4.3) Animais e protocolos experimentais

Camundongos selvagens machos e fêmeas da linhagem C57BL/6j (6 a 8 semanas) foram obtidos do Biotério Central da UFMG e acomodados no Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG. Os animais foram mantidos em micro-isoladores com lotação máxima de 5 animais por acomodação, com livre acesso a água e ração, sob um fotoperíodo automatizado de 12:12 claro/escuro à 21-24 °C.

A fim de facilitar os acasalamentos controlados e avaliação da fecundação posteriormente, o ciclo estral das fêmeas foi determinado pelo método de citologia vaginal, como descrito por (BYERS et al., 2012). Os camundongos fêmeas na fase proestrus ou estrus foram acomodados para o acasalamento controlado com um único animal macho por 16 h. Após este período, foi definido como dia embrionário (DE) 0,5.

As fêmeas com indicativo de gravidez, *i. e.* permanência na fase diestrus após acasalamento, foram infectadas no DE 5,5 com 1×10^6 UFP/animal de ZIKV intraperitonealmente (i.p.). Esse tipo de injeção permite estabelecer viremia rapidamente, sendo mais relevante para estudos da fisiopatologia do ZIKV (WU et al., 2016; XAVIER-NETO et al., 2017). Camundongos controle negativo recebeu volume equivalente de PBS via i.p. Alternativamente, para avaliar o potencial papel do aumento da infecção dependente de anticorpos (ADE) da infecção pelo ZIKV, 10 µg do anticorpo 4G2 foi administrado por via i.p. 24 h antes da infecção pelo ZIKV e, quando necessário, a cada 48 h após a primeira dose, um protocolo experimental semelhante à um trabalho anterior onde foi investigado o ADE da infecção pelo DENV em camundongos imunocompetentes (COSTA et al., 2014). Um anticorpo monoclonal IgG2a de camundongos foi usado como controle de isotípo (Acris GmbH – Alemanha).

Para a avaliação da Ativação Imune Materna (AIM) (Figura 10), amostras de sangue para controle basal foram coletadas das mães grávidas pela veia facial 24 h antes da infecção. Após 2 e 24 h pós-infecção (hpi), os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta do sangue e baço. Os tempos de coleta foram escolhidos com base em outros trabalhos em que a AIM foi avaliada em camundongos, sendo

esses tempos relacionados a períodos iniciais e tardios críticos para mudanças na expressão de genes que codificam para proteínas secretadas relacionadas à resposta imune (ARRODE-BRUSÉS; BRUSÉS, 2012; ENAYATI et al., 2012; MEYER et al., 2006).

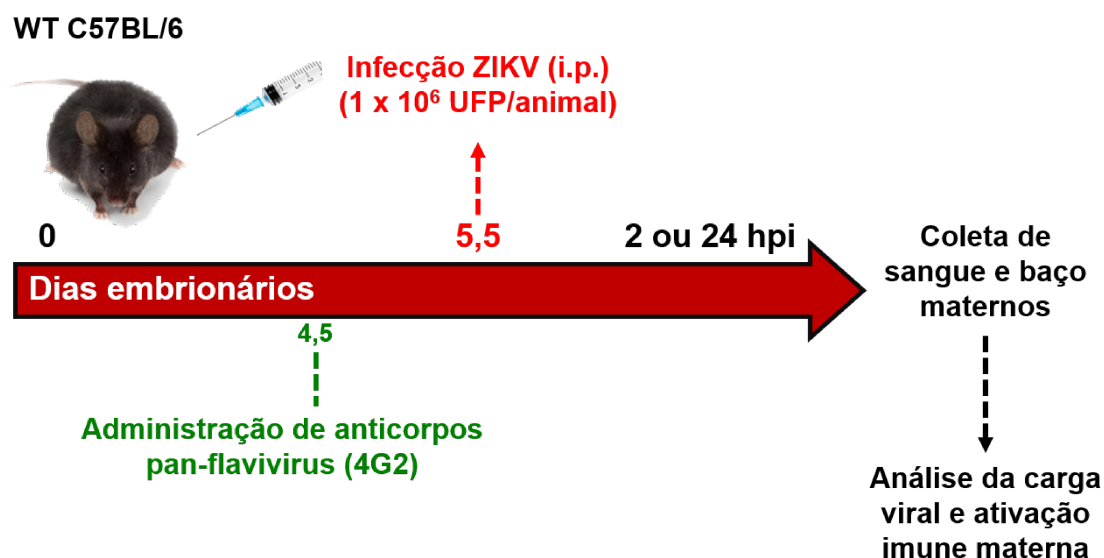


Figura 10: Representação esquemática da estratégia experimental para avaliar a ativação imune materna. Camundongos C57BL/6 fêmeas grávidas foram injetadas com PBS ou 10⁶ UFP/animal de uma cepa brasileira de ZIKV (HS-2015-BA-01) no dia embrionário 5,5 na ausência ou presença do anticorpo monoclonal pan-flavivirus 4G2. O baço e plasma foram coletados a partir da fêmea grávida após 2 ou 24 horas pós-infecção (hpi) para determinação da carga viral por ensaio de formação de placas e da concentração de mediadores inflamatórios por ELISA.

Para a avaliação das alterações no período embrionário causadas pelo ZIKV (Figura 11), as mães grávidas foram anestesiadas e eutanasiadas no DE 15,5 para a extração de tecidos maternos e fetais, de acordo com (MINER et al., 2016b). As placentas e os fetos foram pesados logo após remoção e mantidos à -80 °C até as análises posteriores.

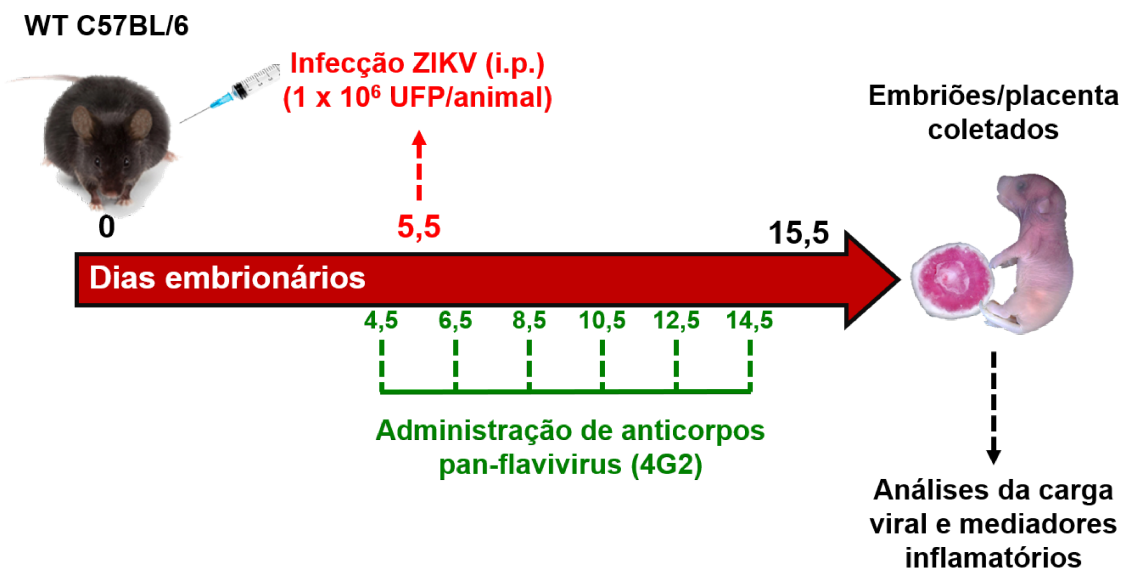


Figura 11: Representação esquemática da estratégia experimental para avaliar as consequências do aumento da infecção materna pelo ZIKV dependente de anticorpos ao nível embrionário. Camundongos C57BL/6 fêmeas grávidas foram injetadas com PBS ou 10^6 UFP/animal de uma cepa brasileira de ZIKV (HS-2015-BA-01) no dia embrionário (DE) 5,5 na ausência ou presença do anticorpo monoclonal pan-flavivirus 4G2. Os embriões e placentas foram coletados no DE 15,5 para as análises posteriores.

Para avaliar a terapia com AH-D (Figura 12), o peptídeo foi administrado diariamente (25 mg/kg) por via intraperitoneal, iniciando 3 dias após a infecção das fêmeas grávidas, as quais foram analisadas no DE 15,5 como descrito acima.

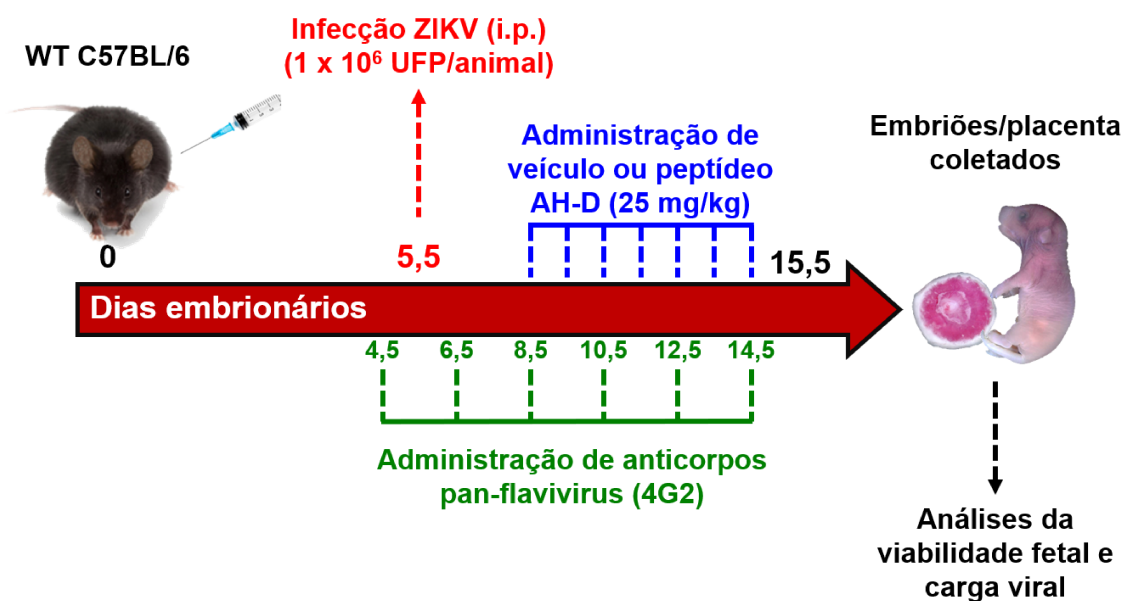


Figura 12: Estratégia experimental para avaliar a eficácia terapêutica do peptídeo AH-D em reduzir consequências adversas da SCZ. Camundongos C57BL/6 fêmeas grávidas foram injetadas com PBS ou 10^6 UFP/animal de uma cepa brasileira de ZIKV (HS-2015-BA-01) no dia embrionário (DE) 5,5 na presença do anticorpo monoclonal pan-flavivirus 4G2. O

peptídeo AH-D foi administrado diariamente, iniciando 3 dias após a infecção (DE 8,5). A eutanásia das fêmeas grávidas para coleta dos embriões e placentas foi realizada no no DE 15,5 para análises da viabilidade fetal e carga viral por RT-qPCR.

No caso das alterações a longo prazo da prole (Figura 13), as fêmeas grávidas foram acomodadas individualmente em micro-isoladores até o nascimento natural dos filhotes. Então, a prole foi desmamada e separada por sexo no dia pós-natal (DPN) 21, num limite máximo de 5 animais por acomodação. Experimentos subsequentes foram realizados durante o desenvolvimento da prole até a 12^a semana de vida, quando os animais foram eutanasiados para análises terminais.

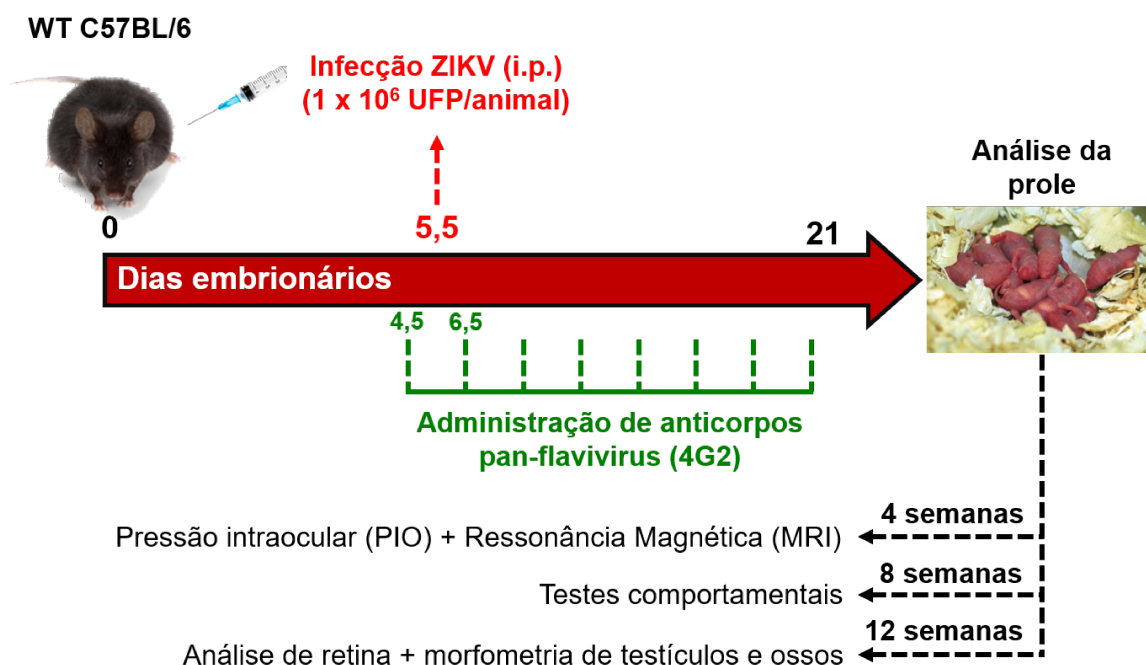


Figura 13: Representação esquemática da estratégia experimental para avaliar as consequências a longo prazo da infecção pelo ZIKV durante a gestação e a exacerbação de anormalidades do neurodesenvolvimento relacionadas à SCZ pela injeção do anticorpo pan-flavivírus 4G2. Camundongos C57BL/6 fêmeas grávidas foram injetadas com PBS ou 10⁶ UFP/animal de uma cepa brasileira de ZIKV (HS-2015-BA-01) no dia embrionário (DE) 5,5 na ausência ou presença do anticorpo monoclonal pan-flavivírus 4G2. O nascimento natural da prole foi permitido para que outras análises fossem realizadas nesses animais, as quais ocorreram entre a 4^a e 12^a semanas de vida.

4.4) Determinação da carga viral

Para determinar a carga viral em estoques virais e amostras de tecidos dos camundongos infectados pelo ZIKV, foram empregadas as técnicas de titulação pelo ensaio de formação de placas e Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR).

Células da linhagem Vero (atcc.org/products/all/CCL-81.aspx) foram crescidas em meio DMEM suplementado com 5% SFB na presença dos antibióticos: fungizona (2 µg/mL), penicilina (100 U/mL) e gentamicina (50 µg/mL). As células foram tripsinizadas, homogeneizadas e implantadas em placa de seis poços a uma densidade de 1×10^6 células/poço. As placas foram incubadas em uma estufa de atmosfera umidificada, de 5% de CO₂, a 37 °C por cerca de 24 h, quando seus poços apresentaram uma monocamada de células com confluência de 70% a 80%. Os tecidos foram pesados e macerados em cadinho e pistilo de porcelana estéreis. Essas amostras e os estoques virais foram diluídos serialmente em meio DMEM com antibióticos na ausência de SFB. A cada poço de uma placa foi adicionado 300 µL de cada uma das diluições (10^{-2} a 10^{-7}) de uma dada amostra. O controle de células correspondeu a um poço não inoculado, ao qual foram acrescentados apenas o meio DMEM com antibióticos na ausência de SFB. As placas foram incubadas por um período de uma hora a 37 °C (período de adsorção viral), durante o qual foram gentilmente movimentadas de 15 em 15 min para garantir uma distribuição homogênea das partículas virais sobre a monocamada de células. Terminado o período de adsorção, o meio foi retirado dos poços e desprezado, e as células lavadas com PBS. Em seguida, foi adicionado meio DMEM contendo 1,6% de carboximetilcelulose, antibióticos e 1,5% de SFB. As placas foram incubadas a 37 °C por 5 dias ou até o desenvolvimento de efeito citopático, observado ao microscópio invertido. As mesmas foram fixadas com formol tamponado a 10% por 2 h e, posteriormente, coradas com solução 1% p/v de cristal violeta em PBS para a determinação do título das amostras, os quais foram expressos em Unidades Formadoras de Placas (UFP) por mililitro ou miligrama de tecido.

Alternativamente, a reação de RT-qPCR foi realizada. As amostras foram processadas e submetidas à extração de RNA usando o RNeasy MiniKit (Qiagen, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante. A reação de amplificação foi realizada utilizando 30 ng de total de RNA extraído com o kit *one-step* Quantinova Probe RT-PCR (Qiagen, Alemanha), segundo instruções do fabricante, e adicionando de 12,5 ng de iniciadores aleatórios (Promega, EUA) por reação. O seguinte par de iniciadores e sonda foram utilizados: iniciador senso CCGCTGCCCAACACAAG; iniciador antisenso CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT; Sonda AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCA. A reação de RT-qPCR foi realizada no *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA) seguindo as

seguintes etapas: 45 °C por 5 min; 95° por 5 min; 40 ciclos de 95 °C por 5 s e 60 °C por 30 s. Para a geração de uma curva padrão semiquantitativa, a RT-qPCR foi realizada usando RNA extraído de uma amostra viral padrão de concentração (UFP/mL) conhecida.

4.5) Mensuração dos níveis de citocinas no soro e tecidos por ELISA

Os níveis de vários mediadores inflamatórios (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, TNF, TGF- β , IFN- α , IFN- β e IFN- γ) foram quantificados no plasma e tecidos pela técnica de ELISA. O plasma foi obtido a partir do sangue total coletado em heparina, após centrifugação a 3.000 g por 5 min e posteriormente armazenado à -20 °C até análise. Fragmentos de tecidos 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 A] e 0,05% Tween 20, na proporção de 100 mg de tecido para cada mL de solução, com o auxílio de um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 – Fisher Scientific International, EUA). Após centrifugação em 3.000 g durante 10 min a 4 °C (Centrífuga BR4 – Jouan, EUA), o sobrenadante foi coletado para as dosagens de citocinas. As amostras de soro e tecidos foram diluídos 1:2 em PBS contendo 0,1% de albumina bovina. As quantificações foram realizadas utilizando kits DuoSet enzyme-linked immunosorbent (R&D Systems, EUA), seguindo os protocolos recomendados pela fabricante e os resultados expressos como pg/100 mg de tecido ou pg/mL de plasma.

Brevemente, os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7,4, sendo que a sensibilização ocorreu durante 18 h a 4 °C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, EUA). As amostras, os padrões e o branco (albumina 0,1%) foram adicionados aos poços e incubados por 18 h. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (*HRP-Streptavidin Pharmingem* – 1:4000) e revelada com OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride* – Sigma-Aldrich, EUA). Após 30 min, a reação foi interrompida com H₂SO₄ e a leitura feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) em comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos como pg/100 mg de tecido ou pg/mL de plasma.

4.6) Análise de neurodesenvolvimento da prole

Os efeitos da infecção pelo ZIKV sobre o neurodesenvolvimento da prole foram avaliados através de diversos ensaios ao longo da vida desses animais. Todas as análises comportamentais foram descritas abaixo e realizadas no mesmo animal, com aproximadamente uma semana de intervalo entre cada teste (n=6; todos os camundongos machos nascidos de 6 mães diferentes em cada grupo). Todos os testes comportamentais foram realizados no laboratório de Neurofarmacologia, do Departamento de Farmacologia (ICB/UFMG) em colaboração com o Professor Antônio C. P. Oliveira.

4.6.1) Teste de sociabilidade

O teste social foi realizado de acordo com (RADYUSHKIN et al., 2009) em uma arena retangular 60 x 40 cm (comprimento x altura), com 3 câmaras e duas paredes divisórias. Em cada parede, pequenas aberturas (6 x 6 cm) permitiram o acesso livre em todo o aparato (câmara central e duas câmaras sociais em cada lado – Câmaras A e B). Todos os testes foram registrados por uma câmera conectada à um computador para análise. O tempo em cada câmara foi analisado automaticamente pelo software Any-maze® (Stoelting Company, EUA).

Inicialmente, para avaliar a sociabilidade animal, o animal teste foi colocado na câmara central do aparato experimental por 5 min com acesso bloqueado para os outros compartimentos, para habituação. Após isso, um animal jovem (25-35 dias de idade), desconhecido do animal teste, dentro de um cilindro plástico foi colocado na câmara social à esquerda ou direita (câmara A) e um cilindro vazio idêntico foi colocado na outra câmara (câmara B). As pequenas aberturas foram liberadas, permitindo que o animal teste explorasse todos os compartimentos por 10 min. O índice de sociabilidade (%) foi calculado como: $[\text{segundos investigando o animal jovem desconhecido na câmara A} / (\text{segundos investigando câmara A} + \text{segundos investigando câmara B})] \times 100$. A localização do animal desconhecido nas câmaras social direita ou esquerda foi alternada entre testes para evitar um possível efeito de preferência lateral.

4.6.2) Labirinto em Y

A fim de avaliar a memória de trabalho da prole, os animais testes foram colocados individualmente no final de um dos braços do aparato e permitidos que explorassem livremente o labirinto por 8 min. O aparato consistia em um labirinto em forma de Y com 3 braços idênticos (A, B e C), com 60° de angulação entre braços adjacentes. Cada braço possuía 30 cm de comprimento, 6 cm de largura e 20 cm de altura. A exploração dos animais foi registrada por câmera e analisada posteriormente. As entradas em cada braço foram registradas e analisadas para calcular a alternância entre braços. Apenas a alternância entre diferentes braços, por exemplo ABC, BCA ou CAB, foi considerada para o cálculo do escore percentual. O índice de alternância (%) foi calculado como: $[\text{alternância total}/(\text{total de entradas nos braços} - 2)] \times 100$, segundo trabalho anterior (DE CASTRO et al., 2009).

4.6.3) Labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado se baseia na tendência natural dos camundongos de aproximar e evitar áreas que apresentam perigo, como a altura, para avaliar o nível de ansiedade desses animais (CRYAN; HOLMES, 2005). O labirinto em cruz elevado foi utilizado avaliar comportamentos associados à ansiedade na prole. O aparato experimental foi posicionado 0,5 m acima do chão e consistia de dois braços abertos e dois fechados (com paredes) de 30 cm de comprimento e 5 cm de largura. O animal teste foi colocado no centro do aparato e permitido que explorasse o labirinto por 6 min. Esse período foi gravado usando uma câmera e o conflito pelo instinto de exploração, prevenção e risco foi observado. A quantidade de entradas e tempo nos braços abertos e fechados foram analisados automaticamente pelo software Any-maze® (Stoelting Company, EUA).

4.6.4) Teste de campo aberto

A avaliação da atividade locomotora basal dos camundongos foi realizada através do teste de campo aberto (SOUSA; ALMEIDA; WOTJAK, 2006). O teste foi realizado num aparato circular de 50 cm de diâmetro e paredes de 40 cm, localizado em uma sala isolada. Os animais testes foram colocados no centro da arena e sua

movimentação foi registrado por meio de uma câmera de vídeo durante 20 min. A distância percorrida, número e tempo no centro da arena foi analisado pelo o Any-maze® (Stoelting Company, EUA).

4.6.5) Teste de preferência a sacarose

O teste de preferência à sacarose foi realizado para avaliar a anedonia, comportamento relacionado à depressão. Esse teste é baseado pela preferência típica do animal, quando possível, de solução doce à água, sendo que a redução desta preferência indica anedonia. Esse teste durou 5 dias e foi realizado de acordo com (BITANHIRWE et al., 2010; DA SILVEIRA et al., 2017). Inicialmente, os animais foram habituados por 3 dias a consumir água a partir de duas garrafas na mesma acomodação (fase de habitação). No terceiro dia, o conteúdo de uma das garrafas foi substituído por 50 mL de solução de sacarose 0,5% e o outro por 50 mL de água. O consumo de água e solução de sacarose foi quantificado a cada 24 h por dois dias consecutivos (fase teste). Após 24 h iniciais da fase teste, o conteúdo das garrafas foi completado para 50 mL e a posição das garrafas foi alternada para evitar efeitos da preferência lateral no comportamento dos animais. A quantificação do consumo foi realizada em ambos os dias da fase teste. A preferência à sacarose foi calculada como um escore percentual: $[(\text{consumo de sacarose}/\text{consumo total de líquidos}) \times 100\%]$, de acordo com (DA SILVEIRA et al., 2017).

4.6.6) Análise neuropatológica usando modelo de dois insultos ambientais

Uma segunda coorte de fêmeas grávidas foi utilizada para os experimentos descritos nesta seção. No período pós-natal da prole, após a separação dos filhotes quanto ao sexo no dia pós-natal 21, os animais machos foram subdivididos em outras gaiolas, onde metade dos animais machos das proles foi submetida ao segundo insulto ambiental caracterizado por um protocolo de estresse imprevisível, enquanto os animais restantes da prole não foram perturbados, seguindo modelo descrito por Giovanoli e colaboradores (2013).

O protocolo de estresse incluiu cinco diferentes estressores aplicados em dias distintos, com intervalo de um dia de descanso entre cada um, sendo eles: (i) choque

elétrico na pata, (ii) estresse por contenção, (iii) privação de água, (iv) estresse por nado forçado e (v) mudanças repetidas de acomodações.

- *Choque elétrico (dia 1)*: os animais do grupo de exposição ao estresse foram colocados em uma sala com iluminação predominantemente artificial para a realização desse procedimento utilizando o aparato de medo condicionado (35 x 20 cm). Os animais foram colocados individualmente no aparato e as luzes foram desligadas durante o período experimental. Após um período inicial de 3 min, os animais receberam 3 choques elétricos leves na pata (0,3 mA por 1 s) com intervalo de 3 min entre cada um, seguido por outro período final de 3 min sem choques. Em seguida, os animais foram retornados imediatamente às suas acomodações;
- *Estresse por contenção (dia 3)*: cada animal do grupo de estresse foi mantido individualmente em tubos de 50 mL transparentes (diâmetro: 3 cm; comprimento: 11,5 cm) por 45 min. Os tubos foram previamente perfurados (2 mm de diâmetro) em diversos locais para facilitar a respiração do animal no período experimental. Os tubos foram imobilizados com o auxílio de uma fita crepe em uma mesa de madeira durante o procedimento. Ao final do período, os animais foram retornados imediatamente às suas acomodações;
- *Estresse por privação de água (dia 5)*: os animais designados ao grupo de estresse passaram por um período de 16 h privados de água. Uma vez que os animais do grupo estavam acomodados na mesma gaiola, as garrafas de água foram removidas às 16 h do dia 5 e recolocadas novamente no dia seguinte às 8 h. A acesso a alimentação dos animais durante o período de privação de água foi mantido;
- *Estresse por nado forçado (dia 7)*: os animais do grupo de estresse foram submetidos a duas sessões de nado forçado utilizando um béquer de vidro (5 litros) contendo água (18 °C, 20 cm de profundidade). Cada sessão teve duração de 1 min, separadas por um intervalo de 3 min. Neste intervalo, os animais foram mantidos em uma gaiola separada contendo maravalha limpa. Ao final da última sessão, os animais foram secados com o auxílio de uma toalha e retornados imediatamente às suas acomodações;
- *Mudanças repetidas de acomodações (dia 9)*: os animais do grupo de estresse foram submetidos à diversas mudanças de acomodações durante o período

escuro do ciclo claro/escuro. Para isso, os animais desse grupo foram transferidos para uma nova gaiola contendo maravalha limpa juntamente com sua garrafa de água e ração, sendo esse procedimento repetido cinco vezes em intervalos irregulares.

Após o término deste período experimental, os animais foram mantidos sem perturbações até a 8ª semana de vida, quando a série de testes comportamentais foi iniciada. Além dos testes descritos anteriormente (itens 4.6.1 a 4.6.5), testes adicionais foram realizados apenas nos animais dessa seção, como descritos a seguir. Além da análise comportamental, o volume cerebral dos animais também foi quantificado na 12ª semana de vida, conforme metodologia descrita abaixo (item 4.6.9).

4.6.7) Teste de memória social

O teste foi realizado de acordo com (RADYUSHKIN et al., 2009). Após o período inicial de 10 min para a avaliação da sociabilidade do animal teste, conforme descrito no item 4.6.1, um segundo animal jovem desconhecido foi colocado na outra câmara social previamente vazia (câmara B) e a memória social foi avaliada num novo período de 10 min. O índice de memória social foi calculado como: $[\text{segundos investigando o animal desconhecido na câmara B} / (\text{tempo investigando o estranho 1} + \text{tempo investigando o estranho 2})] \times 100$.

4.6.8) Teste de enterramento de esferas

Os transtornos do espectro autista (TEA) são doenças psiquiátricas que constituem um problema de saúde pública mundial relevante. Uma característica marcante nessa condição patológica é a expressão de comportamentos repetitivos de forma compulsiva, que podem até resultar em lesões em casos mais extremos. Então, para avaliar o comportamento compulsivo dos animais, o teste de enterrar esferas (“*marble burying*”) foi empregado (ANGOJA-PÉREZ et al., 2013). Microisoladores foram preenchidos com 7 cm (altura) de maravalha autoclavada e 20 esferas de vidro foram distribuídas sobre a superfície da gaiola de forma equidistante (4x5). Então, cada animal teste foi colocado no centro da gaiola, que foi subsequentemente tampada, e deixado por 15 min como o período do teste. Após isso, o animal foi

retirado e o número de esferas enterrada foi quantificado. Uma esfera enterrada foi considerada quando nenhuma parte de sua superfície era visível, sendo que ela deveria estar abaixo da altura inicial da maravalha.

4.7) Análise de Ressonância Magnética

O acompanhamento volumétrico cerebral foi realizado por imagens de ressonância magnética (MRI) com 4, 8 e 12 semanas de vida das fêmeas ou apenas com 12 semanas dos machos (n=6; 1-2 animais de 6 mães diferentes em cada grupo). No caso da coorte de animais do modelo de dois insultos ambientais, animais de 3 mães de cada grupo foram analisados. Os experimentos de MRI foram realizados usando um sistema 4.7T NMR (Oxford Systems, Reino Unido) controlado por um controlador de imagens UNITY Inova200 (Varian, EUA). O protocolo de imageamento consistiu de 20 imagens coronais ponderadas em T2 (TR = 3000 ms, TE =50 ms) com 1 mm de espessura. Os camundongos foram anestesiados durante todo o procedimento (cerca de 50 min por animal) com halotano (4% de indução, 1,5% de manutenção) e oxigênio (1,5 L/min) via máscara facial. Todas as medidas morfométricas cerebrais foram realizadas pelo software NIH ImageJ. O volume cerebral total (mm³) foi calculado através do somatório da área de cada secção (mm²) multiplicado pela espessura das fatias (1 mm), sendo 7 fatias sequenciais de +2,8 a -3,2 cm a referenciados a partir do Bregma. Essas análises foram realizadas no Centro de Tecnologia em Magneto-Ressonância em colaboração com os Professores Márcio F.D. Moraes (Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB/UFMG) e Eduardo M.A.M. Mendes (Departamento de Engenharia Eletrônica – Escola de Engenharia/UFMG).

4.8) Análise histopatológica e imuno-histoquímica do cérebro

Após a prole atingir 12 semanas de vida, os camundongos foram eutanasiados e o cérebro coletado para diversas análises de imunocoloração. Após remoção, os cérebros foram fixados em paraformaldeído 10% em PBS por 48 h. Para análise por hematoxilina e eosina, as amostras foram retiradas da solução de paraformaldeído e processadas como descritas por Jackman e colaboradores (2018). Um patologista analisou o índice histopatológico do córtex cerebral e inflamação da meninge de

maneira cega. As amostras de córtex cerebral foram graduadas da seguinte forma: 0, sem danos; 1, destruição tecidual mínima e/ou gliose/inflamação leve; 2, destruição tecidual leve e/ou gliose/inflamação moderada; 3, destruição tecidual definida (perda neuronal e dano parenquimal) e inflamação intensa; 4, necrose. Inflamação meníngea foi graduada de 0 a 4: 0, sem inflamação; 1 a 4 correspondem a 1 a 4 camadas celulares, respectivamente. A soma dos índices do córtex cerebral e meninge compreenderam o índice final, de até 8 pontos.

Para as análises de imunohistoquímica, as amostras foram retiradas da solução de paraformaldeído e imersas em solução de sacarose 30% por 24 h. Então, as amostras foram congeladas em isopentano (Sigma-Aldrich, EUA) resfriado em nitrogênio e posicionado em moldes resfriados após inclusão em meio congelante OCT (Cell Path, Reino Unido). As amostras foram fatiadas em criostato (Leica CM3050S, Leica Biosystems, Alemanha) e secções de 30 µm de espessura foram coletadas em lâminas revestidas com gelatina. A imunohistoquímica das fatias de córtex foi realizada para avaliação do número de micróglia (Iba-1), neurônios (NeuN) e astrócitos (S100β), seguindo procedimentos fornecidos pelos fabricantes (Vector Elite kit, Vector Laboratories, EUA). A neurodegeneração foi avaliada por coloração com Fluoro Jade C, como descrito por (SCHMUED et al., 2005). Para a coloração, 2 fatias de cada cérebro de 5 animais foram utilizadas, sendo esses animais provenientes de 5 mães diferentes. Três imagens representativas de cada secção foram quantificadas usando o software NIH ImageJ e os resultados foram representados por mediana de todas as contagens por animal.

4.9) Análise oftalmológica da prole

4.9.1) Medição da pressão intraocular

Entre a 4^a e 12^a semana de vida, a pressão intraocular (PIO) da prole foi realizada semanalmente usando um tonômetro de aplanção (Tono-Pen Vet, Reichert Technologies, EUA), no qual foi calibrado antes do uso, como descrito por (FOUREAUX et al., 2015a). Brevemente, a córnea do animal foi instilada com um anestésico tópico contendo 1% de hidrocloreto de tetracaína e 0,1% de hidrocloreto de fenilefrina. Então, o tonômetro foi posicionado perpendicularmente à região apical

da córnea e três leituras da PIO foi realizada no olho direito. A leitura em apenas um dos olhos foi definida após avaliação inicial de ambos os olhos e ser verificado que não havia diferença dos valores de PIO obtidos. O valor de PIO foi calculado como a média das três medidas e expressos como média \pm SEM de todos os animais de cada grupo. Para evitar variações circadianas da PIO, todas as análises foram realizadas no mesmo dia da semana e período do dia (entre 9:00 e 12:00). As medidas de PIO foram realizadas em colaboração com a Professora Giselle Foureaux, do laboratório de Biologia Transversal, Departamento de Morfologia (ICB/UFMG).

4.9.2) Análise histopatológica

Após eutanásia, ambos os olhos foram enucleados para análises histopatológicas (n=5-6; um animal aleatório de 5-6 diferentes mães de cada grupo). As secções histológicas foram preparadas após fixação por 24 h em solução de Bouin, para a contagem de células ganglionares da retina (CGR) e expressão de caspase-3, segundo (FOUREAUX et al., 2015b). Resumidamente, as fatias dos olhos foram coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) para contagem de CGR, na qual foi realizada manualmente contando toda a extensão neuronal da retina com o auxílio de um microscópio (Olympus BX 41, EUA). A imunohistoquímica para avaliação da caspase-3 em CGR foi realizada usando anticorpos policlonais de coelho anti-caspase 3 (1:200; Sigma-Aldrich, EUA). As fatias coradas foram analisadas usando um microscópio, registrando o número de células caspase-3 positivas por 100 CGR.

4.10) Análise testicular da prole

4.10.1) Preparação dos tecidos

Após eutanásia, a orquiectomia bilateral foi realizada e os testículos foram separados do epidídimo, pesados e cortados longitudinalmente com uma navalha em fragmentos menores. Os testículos foram fixados por 24 h através da imersão em solução de Bouin, incluído em metacrilato glicol (GMA – Leica Historesin Embedding Kit, Leica Biosystems, Alemanha) e em Paraplast® (Merck, EUA) para análises histológicas, estereológicas e de imunocoloração (n=5; um animal aleatório de 5 mães

diferentes em cada grupo). Todas as análises testiculares descritas abaixo foram realizadas em colaboração com o Professor Guilherme M.J. Costa, do laboratório de Biologia Celular, Departamento de Morfologia (ICB/UFMG).

4.10.2) Análises morfométricas do parênquima testicular e túbulos seminíferos

Volume dos compartimentos do tecido testicular foi estimado pela contagem de 6615 pontos no parênquima dos testículos. O diâmetro dos túbulos seminíferos e o lúmen tubular foram analisados num aumento de 200X usando uma ocular calibrada com micrômetro de estágio. Trinta secções tubulares (circulares ou semicirculares) foram selecionadas aleatoriamente e medidas em cada animal, como descrito por (JOHNSON; NEAVES, 1981). A morfologia dos túbulos seminíferos de cada camundongo foi classificada de acordo com suas características epiteliais: 1) apresentando todos os tipos de células germinativas sem apoptose; 2) presença de apoptose ou degeneração de células germinativas; 3) ausência de algumas camadas de células germinativas; 4) apresentando retenção de corpos residuais. Usando estas características, 30 secções tubulares foram analisadas aleatoriamente por animal.

4.10.3) Número de células

- Células germinativas: as células no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero (SEC) foram contadas em 10 secções de túbulos seminíferos por camundongo. As contagens foram corrigidas de acordo com o método descrito por (ABERCROMBIE, 1946) e modificado por (AMANN, 1962). As proporções celulares foram alcançadas através dessas contagens corrigidas.
- Células de Leydig: o volume de células de Leydig foi obtido usando o volume nuclear assim como a proporção entre núcleo e citoplasma. Para isto, 30 núcleos foram medidos por animal. O volume nuclear da célula de Leydig foi obtido usando a fórmula para cálculo do volume de esferas ($\frac{4}{3}\pi R^3$, onde $R = \text{diâmetro nuclear}/2$). A proporção entre núcleo e citoplasma foi estimado contando 1000 pontos ao longo das células de Leydig de cada animal. O número de células de Leydig foi estimado a partir do tamanho individual e volume total ocupado por essas células no parênquima testicular.

4.10.4) Análise de imunohistoquímica

Secções seriadas de 5 µm de espessura foram marcadas para caspase-3 usando protocolos com diluição de anticorpos previamente testadas. Após diafinização e reidratação, a recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato (pH 6,0) por 5 min após ebulição em um micro-ondas (tempo total de 10 min). Peroxidase endógena foi inativada por 30 min com 3% H₂O₂ (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS a temperatura ambiente. Anticorpo primário anti-Caspase-3 policlonal de coelho (IM-0035, 1:100, Abcam, Reino Unido) foi aplicado e as fatias incubadas por 16 h a 4 °C. As fatias foram expostas à anticorpos IgG de cabra biotinizados anti-coelho (ab672, 1:200, Abcam, Reino Unido) durante 60 min a temperatura ambiente. A detecção foi realizada através de incubação das secções em streptavidina por 10 min em temperatura ambiente, seguido de reação com o substrato de peroxidase 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, EUA) e contra corados com hematoxilina (Merck, EUA). Após desidratação, as fatias foram cobertas com lamínulas, montadas com Entellan (Merck, EUA) e analisadas. A fim de quantificar o índice de células apoptóticas, 15 secções tubulares (circulares ou quase circulares) foram selecionadas aleatoriamente e analisadas por animal. Os dados foram expressos dividindo o número de células germinativas apoptóticas por área de epitélio seminífero, medido usando o software NIH ImageJ.

4.11) Análise óssea da prole

4.11.1) Microtomografia computadorizada

A microarquitetura trabecular e a densidade óssea dentro da região metafisiária dos fêmures distais foram quantificados usando microtomografia computadorizada (microCT). Após eutanásia, os fêmures foram dissecados, fixados por 48 h em formalina tamponada 10% e escaneados usando um sistema de microCT (Skyscan 1172 X-ray microtomograph, Aartselaar, Bélgica) (BOUXSEIN et al., 2010; MACARI et al., 2018). As imagens foram analisadas a partir do software CT-Analyzer, calibrado com fantasmas de hidroxiapatita de cálcio com densidade conhecida (Skyscan, Bélgica). Contorno anatômico irregular a alguns *pixels* de distância do limite

endocortical foi usado como método de contorno. Os parâmetros analisados foram: densidade mineral óssea (BMD), porcentagem de volume ósseo trabecular/volume total (BV/TV%), volume ósseo (BV), índice de modelo de estrutura (SMI), espessura das trabéculas (Tb.Th), separação das trabéculas (Tb.Sp) e o número de trabéculas (Tb.N). Essas análises foram realizadas em colaboração com o Professor Gustavo P. Garlet, do departamento de Ciências Biológicas (Escola de Odontologia de Bauru – USP). Já as análises ósseas adicionais descritas abaixo foram realizadas em colaboração com as Professoras Soraia Macari e Tarcília Silva, da Faculdade de Odontologia (UFMG).

4.11.2) Cultura de células

As células de medula óssea (BMC) foram obtidas de fêmures dos camundongos dos grupos PBS e ZIKV. Para formação de osteoclastos, as BMC foram cultivadas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (FBS, Gibco, EUA). As células foram estimuladas com fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF, 30 ng/mL; R&D System, EUA) e RANKL (10 ng/mL; R&D System, EUA) para diferenciarem em osteoclastos. Coloração de TRAP (Sigma-Aldrich, EUA) foi realizada de acordo com instruções do fabricante e o número de células TRAP positivas (TRAP+) foi determinado pela contagem do número de células em 10 campos por poço no aumento de 40X.

A diferenciação osteoblástica em BMC aderentes foi induzida através do cultivo em um meio contendo 10% FBS, 100 μ M de ácido L-ascórbico 2-fosfato, 10 nM de dexametasona e 5 mM de β -glicerofosfato (β -GP). O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. No dia 21 pós-indução, os níveis de fosfatase alcalina (ALP) foram quantificados usando o kit SensoLyte pNPP ALP assay (AnaSpec, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

4.11.3) Histomorfometria

Os fêmures foram fixados em formalina 10%, descalcificada em EDTA 14% e incluídos em parafina. As secções sagitais de 5 μ m foram coradas com HE para a densidade de osteócitos por área de osso trabecular, com fosfatase ácida resistente

ao tartarato (TRAP; Sigma-Aldrich, EUA) para análise de osteoclastos TRAP+ e para coloração de Tricromo de Masson, usado para osteoblastos por perímetro de osso trabecular. Cinco secções por animal foram avaliadas com o auxílio de um microscópio (Olympus AX70 Light, Microscope Olympus Corporation, Japão). As medidas foram realizadas no fêmur distal excluindo a placa epifisária, onde a metáfise distal foi fotografada sob aumento de 40X no microscópio de luz conectado à uma câmera digital (PowerShot A620, Canon, Japão) e as células ósseas foram medidas usando o software NIH ImageJ.

4.11.4) Extração de RNA e Qpcr

Para análise de qPCR, o RNA total foi extraído a partir da metáfise distal usando trizol, seguido de purificação em coluna (RNeasy Mini Kit, Qiagen, EUA). A integridade das amostras de RNA foram avaliadas pela análise de 1 µg de RNA total pelo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA), segundo instruções do fabricante. Após a extração do RNA, DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 4 µL de RNA através da reação de transcrição reversa usando Superscript Vilo Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os genes alvo analisados foram RANK (*Tnfrsf11a*), RANKL (*Tnfsf11*), osteoprotegerina (OPG, *Tnfrsf11b*), relação RANKL/OPG, TNF-α (*Tnf*) e interleucina 6 (*il6*), sendo os níveis de mRNA quantificados por meio de qPCR usando SYBR Green PCR Master Mix. O protocolo de ciclos consistiu de uma etapa de pré-incubação a 95 °C por 10 min para aumentar a sensibilidade de detecção, 45 ciclos de amplificação iniciando a 95 °C por 10 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 1 s, seguido de uma etapa única de resfriamento a 40 °C por 10 s. Os dados foram analisados usando o software Light Cycler® 480. As sequências dos iniciados foram desenhadas com base nas sequências de nucleotídeos nas bases de dados do NCBI e Ensemble. A expressão de cada gene foi normalizada pela expressão média do gene controle desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) e quantificada usando o limiar do ciclo (Ct) e cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (MACARI et al., 2016).

4.12) Análise estatística

Todos os dados foram testados para normalidade e homocedasticidade das variâncias. Dados quantitativos foram apresentados como mediana, com exceção da

PIO e ganho de peso das fêmeas grávidas, os quais foram mostrados como média±SEM (erro padrão da média). As análises foram realizadas usando o software Prism v7.0 (GraphPad Software Inc, EUA). Os dados foram analisados usando diferentes testes quando necessário. Teste t não paramétrico para comparação entre dois grupos. *One-way* ANOVA foi usado para comparação entre três ou mais grupos seguido de Newman-Keuls no caso de distribuição normal ou Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn no caso de dados não paramétricos. Dados de peso corporal e volume cerebral das fêmeas no período pós-natal, além da PIO das proles, foram analisados por *two-way* ANOVA e Newman-Keuls como teste *post-hoc*. Os resultados foram considerados significativos quando valor $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1) A infecção pelo Zika virus induz a Ativação Imune Materna (AIM)

A fim de avaliar a capacidade do ZIKV de induzir AIM, camundongos fêmeas grávidas C57BL/6j foram infectados com 10^6 UFP de ZIKV por via intraperitoneal (i.p.). A injeção foi realizada no dia embrionário (DE) 5,5, que é equivalente à exposição ao ZIKV no primeiro trimestre em humanos, mais especificamente de aproximadamente 2 semanas (XAVIER-NETO et al., 2017). Os animais foram eutanasiados e amostras de plasma e baço foram coletadas 2 ou 24 horas pós-infecção (hpi) para análise da carga viral e dos níveis de mediadores inflamatórios por ELISA. Em paralelo, para mimetizar uma infecção secundária, outras fêmeas grávidas foram injetadas com uma dose subneutralizante (10 µg) de um anticorpo anti-proteína E de flavivírus (4G2) 24 h antes da infecção pelo ZIKV, grupo denominado 4G2+ZIKV neste trabalho, com o objetivo de avaliar se o fenômeno de aumento da infecção dependente de anticorpos (ADE) poderia exacerbar as alterações induzidas pelo ZIKV (Figura 10). Ao longo dos experimentos, o grupo controle negativo foi injetado com uma solução salina tamponada (PBS) e o grupo controle positivo recebeu um anticorpo controle de isotipo IgG2a sem especificidade contra o ZIKV (grupo ZIKV).

Os resultados obtidos mostraram que 10^3 partículas virais viáveis foram recuperadas do plasma das fêmeas grávidas infectadas pelo ZIKV e tratadas com controle de isotipo em 2 hpi (Figura 14A). Nesse mesmo tempo, 10^5 partículas viáveis foram detectadas nos animais injetados com 4G2 antes da infecção pelo ZIKV para emular uma infecção secundária (4G2+ZIKV). Em 24 hpi, nenhuma partícula viral viável foi detectada nos grupos analisados. No baço desses animais, a carga viral foi similar nos grupos ZIKV e 4G2+ZIKV em ambos os tempos analisados (Figura 14B), sendo que não houve recuperação importante do número de partículas virais.

A análise dos mediadores inflamatórios revelou um aumento nas concentrações das quimiocinas CCL2 (Figura 14C) e CXCL10 (Figura 14D) no baço das fêmeas grávidas infectadas com ZIKV após 2 hpi quando comparadas ao grupo controle injetado com PBS. Estas concentrações retornaram ao nível basal após 24 hpi (Figura 14C-D). Entretanto, níveis elevados de CCL2 foram encontrados no baço dos animais 4G2+ZIKV (Figura 14C) em ambos os tempos analisados em relação ao grupo PBS. Em relação a CXCL10 (Figura 14D), concentrações elevadas foram

detectadas no grupo 4G2+ZIKV em relação aos animais PBS e ZIKV apenas com 24 hpi, embora essa diferença tenha sido observada por uma redução maior nesse período nos grupos PBS e ZIKV, não aumento no grupo 4G2+ZIKV em si. Além disso, o aumento nas concentrações das citocinas IL-6 (Figura 14E) e IL-17 (Figura 14F) no plasma apresentou o mesmo perfil: aumento de IL-6 após 2 hpi e aumento de IL-17 com 24 hpi em ambos os grupos infectados em relação ao grupo PBS.

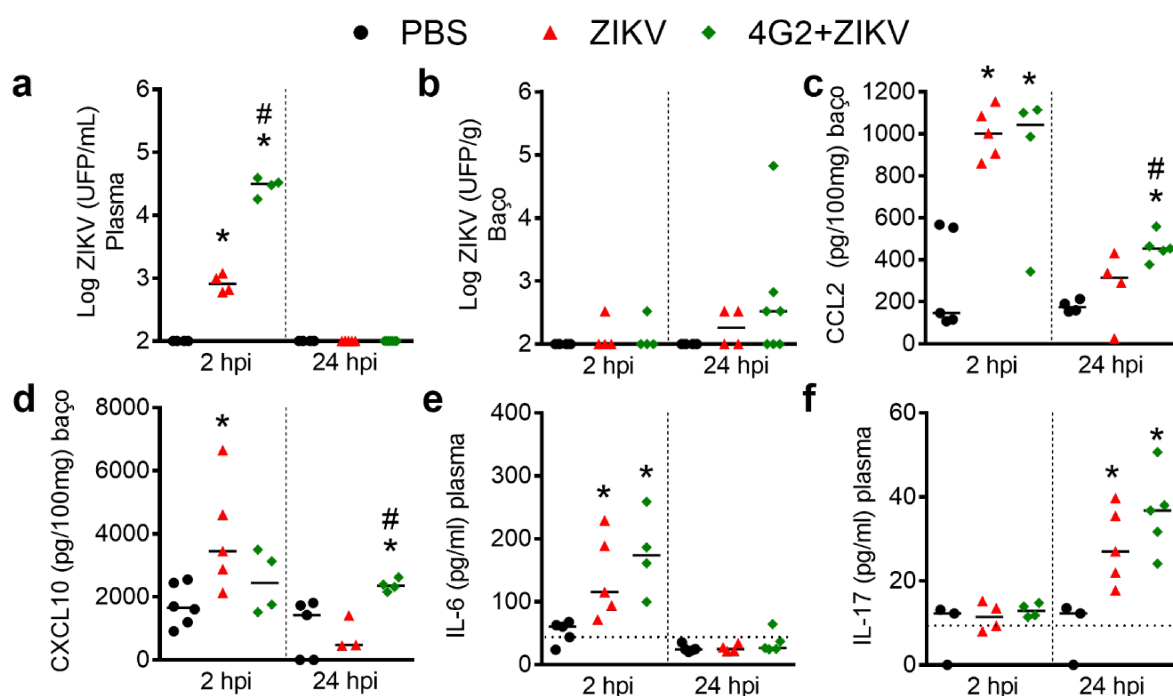


Figura 14: Análise da carga viral e dos níveis de mediadores inflamatórios alterados após infecção pelo ZIKV na presença ou ausência de anticorpos pan-flavivirus. O baço e o plasma maternos foram coletados 2 (lado esquerdo dos gráficos) e 24 (lado direito dos gráficos) horas após infecção pelo ZIKV na ausência (triângulos vermelhos) ou presença (losangos verdes) de anticorpos pan-flavivirus. Animais controle foram injetados com volume equivalente de PBS (círculos pretos). A carga viral foi avaliada pelo ensaio de formação de placas (A-B) e expressa como log do valor de unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro de plasma ou grama de baço. As concentrações de CCL2 (C), CXCL10 (D) foram determinadas por ELISA e expressas como picogramas por 100 mg de tecido, enquanto níveis de IL-6 (E) e IL-17 (F) foram expressos como picogramas por mililitro de plasma. Todos os resultados foram apresentados como mediana e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS. #, $p < 0,05$ vs. grupo ZIKV, como avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn (A) ou ANOVA seguido do pós-teste Newmann-Keuls (C-F). Linhas pontilhadas em E e F indicam a concentração basal das citocinas determinadas por amostras de plasma coletadas dos animais 24 h antes da infecção.

Além disso, nenhuma alteração nos níveis das quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL9 (Figura 15A-D) no baço dos grupos ZIKV e 4G2+ZIKV foi observada em

comparação com o grupo controle injetado com PBS nos tempos de 2 e 24 hpi. Além de IL-6 no baço, as citocinas IFN- γ , TNF, IL-1 β e IL-10 também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos comparados no baço (Figuras 15E-I) ou plasma (Figura 16). No geral, esses resultados indicam que a administração do anticorpo 4G2 pode aumentar a internalização inicial do vírus e/ou a infecção pelo ZIKV em camundongos fêmeas grávidas. Ainda, a infecção pelo ZIKV é capaz de desencadear uma resposta imune nos estágios iniciais da infecção nas fêmeas grávidas e que o tempo necessário para o equilíbrio dessa resposta pode ser prolongado na presença de anticorpos pan-flavivírus.

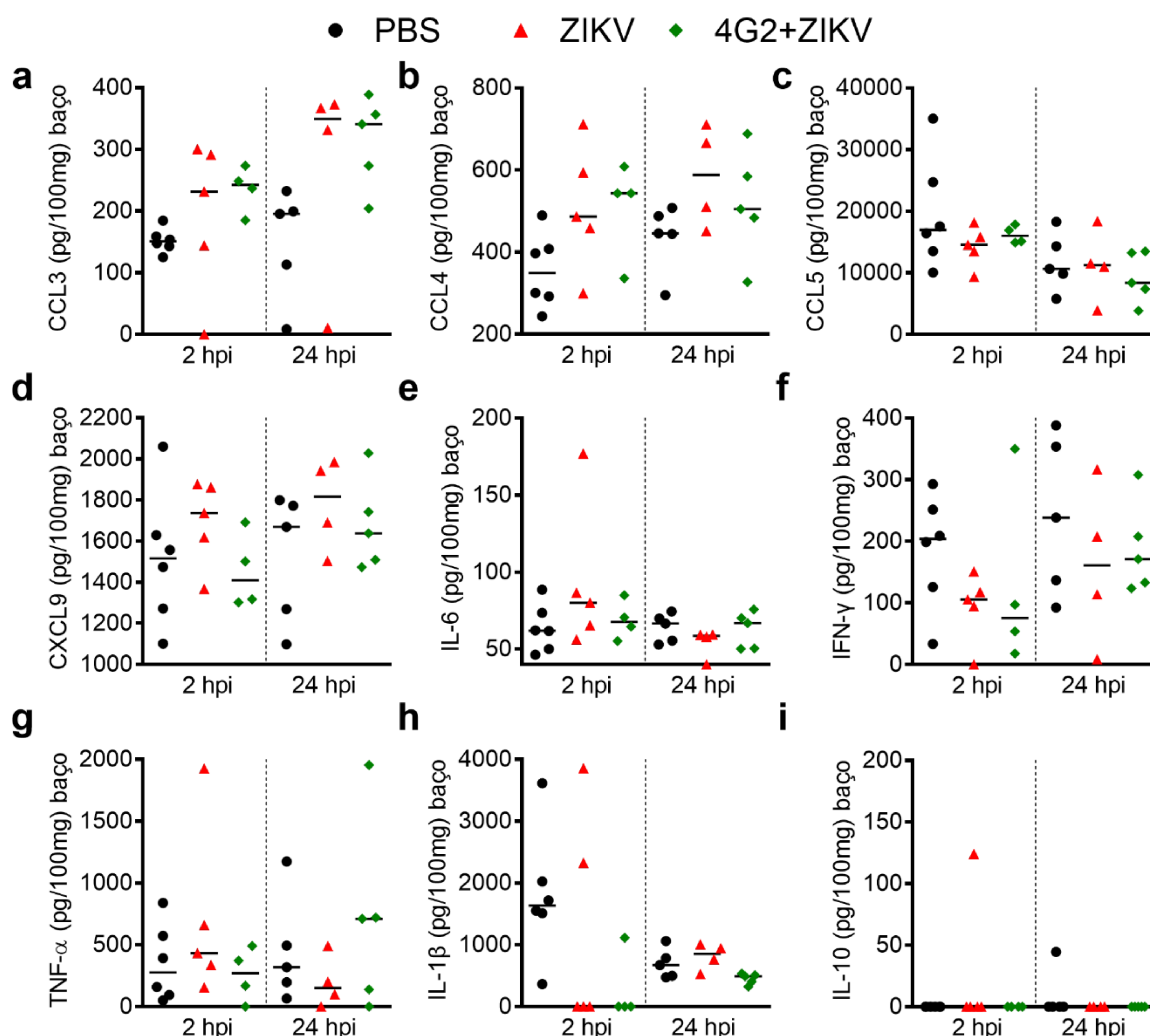


Figura 15: Citocinas do baço das fêmeas grávidas não alteradas após a infecção pelo ZIKV. O baço materno foi coletado 2 (lado esquerdo dos gráficos) e 24 (lado direito dos gráficos) horas após infecção pelo ZIKV na ausência (triângulos vermelhos) ou presença (losangos verdes) de anticorpos pan-flavivírus. Animais controle foram injetados com volume equivalente de PBS (círculos pretos). As concentrações, determinadas por ELISA, de CCL3

(A), CCL4 (B), CCL5 (C), CXCL9 (D), IL-6 (E), IFN- γ (F), TNF (G), IL-1 β (H) e IL-10 (I) foram expressas como picogramas por 100 mg de tecido. Todos os resultados foram apresentados como mediana e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

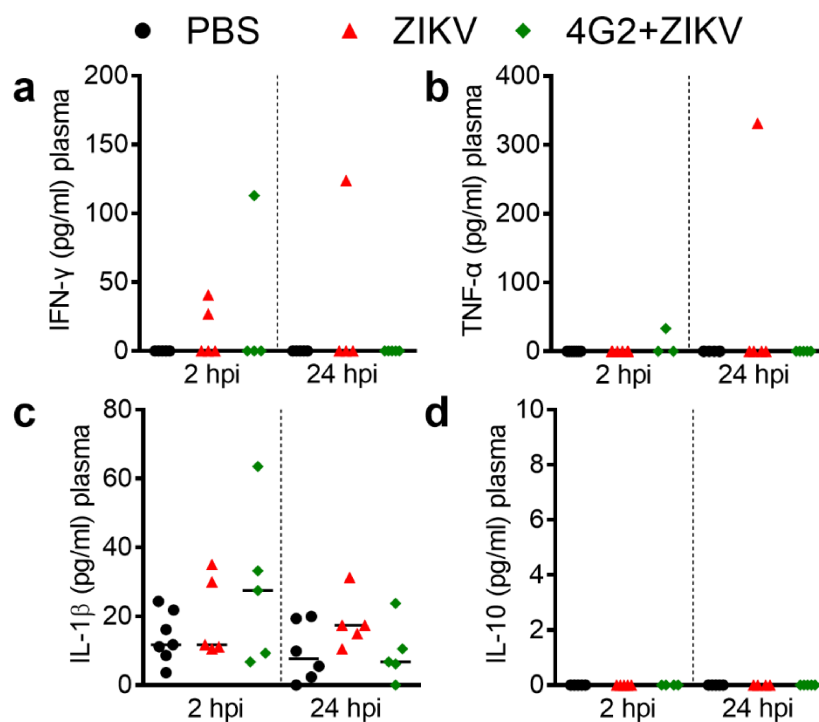


Figura 16: Citocinas do plasma das fêmeas grávidas não alteradas após a infecção pelo ZIKV. O plasma materno foi coletado 2 (lado esquerdo dos gráficos) e 24 (lado direito dos gráficos) horas após infecção pelo ZIKV na ausência (triângulos vermelhos) ou presença (losangos verdes) de anticorpos pan-flavivirus. Animais controle foram injetados com volume equivalente de PBS (círculos pretos). As concentrações, determinadas por ELISA, de IFN- γ (A), TNF (B), IL-1 β (C) e IL-10 (D) foram expressas como picogramas por mililitro de plasma. Todos os resultados foram apresentados como mediana e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

5.2) A infecção pelo ZIKV induz dano placentário e fetal, que é agravado pelo pré-tratamento com anticorpo 4G2

Camundongos fêmeas grávidas receberam doses subneutralizantes de 4G2 24 h antes da infecção pelo ZIKV e a cada 48 h após a primeira injeção de anticorpos até o DE 14,5. No DE 15,5, uma cesariana foi realizada para a coleta dos embriões e placenta, onde foram analisados como representado na Figura 11. Para assegurar que as injeções intraperitoneais consecutivas não induziriam um estresse adicional às fêmeas grávidas e suas proles, o mesmo protocolo experimental, incluindo métodos de contenção e injeções foram aplicados aos grupos controle negativo, que recebeu PBS, e ZIKV, que foi injetado com anticorpos IgG2a inespecíficos.

Os resultados demonstraram que a infecção pelo ZIKV resultou em uma redução de aproximadamente 7% da viabilidade fetal (Figura 17A) quando comparados com os controles PBS. Já a morte fetal no grupo 4G2+ZIKV foi cerca de 17%, proporção significativamente menor que do grupo PBS. A Figura 17B apresenta fotos representativas de proles de todos os grupos do trabalho. As malformações observadas foram a reabsorção quase completa do tecido embrionário, muitas vezes restando apenas um resquício da placenta, como pode ser visto em destaque no painel referente ao grupo 4G2+ZIKV (Figura 17B).

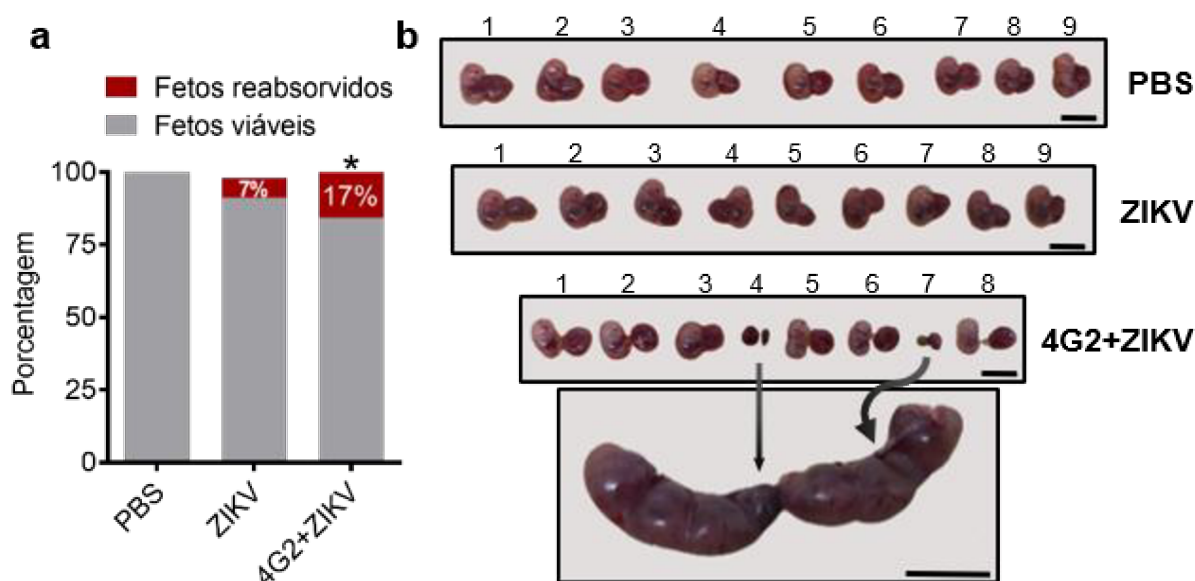


Figura 17: Alterações na viabilidade fetal devido a infecção pelo ZIKV. Após as coletas no DE 15,5, as más-formações foram registradas (A). Fotos representativas de proles de cada grupo estão mostrados em B, onde duas más-formações estão destacadas por setas no painel inferior, o qual se refere a um útero derivado do grupo 4G2+ZIKV. *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS determinado por teste exato de Fisher. A barra de escala representa 1 cm em todas as imagens.

Os embriões e placentas foram coletados, pesados e a infecção da placenta e do cérebro fetal foi avaliada por meio da quantificação dos níveis de RNA do ZIKV por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) e também pelo ensaio de formação de placas. De acordo com os resultados anteriores, uma redução mais pronunciada do peso fetal de embriões viáveis foi observada no grupo 4G2+ZIKV quando comparados com os grupos PBS e ZIKV (Figura 18A). Ainda, uma carga de RNA do ZIKV maior foi detectada nos cérebros fetais do grupo 4G2+ZIKV em comparação com os animais que foram apenas infectados com ZIKV (Figura 18B). Ambos os grupos infectados apresentaram uma redução similar do peso placentário em relação ao grupo PBS

(Figura 18C). O RNA viral foi detectado em placentas de ambos os grupos infectados, embora em níveis semelhantes (Figura 18D). Partículas virais infecciosas não foram detectadas nos tecidos avaliados (dados não mostrados).

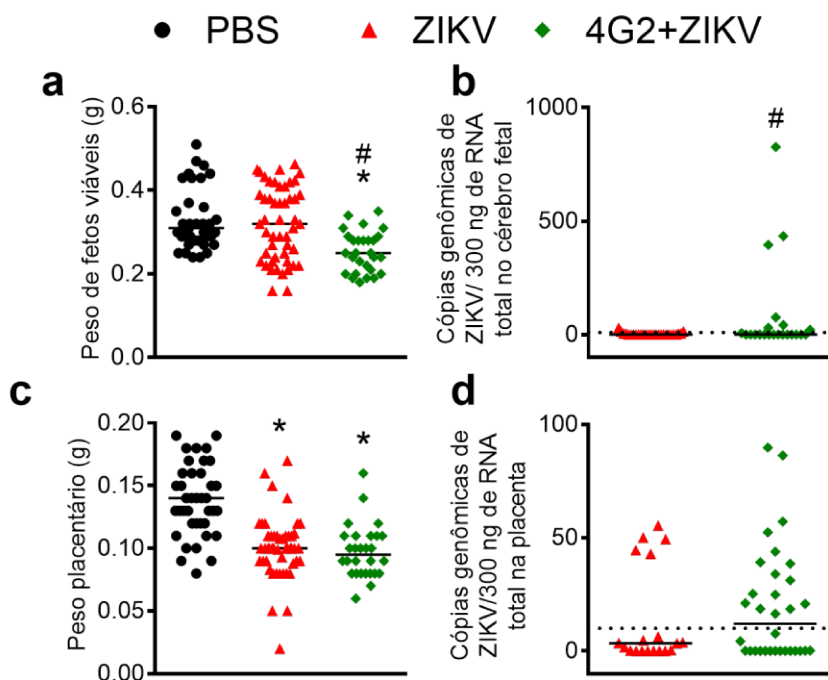


Figura 18: Alterações embrionárias e a carga viral associadas com a infecção pelo ZIKV. Os embriões (A) e placentas (B) foram coletas no DE 15,5 e pesados. O RNA do ZIKV foi quantificado por qRT-PCR no cérebro fetal (C) e na placenta (D). Os dados de pesos foram expressos como mediana e os resultados de qRT-PCR como mediana do número de cópias do RNA de ZIKV por 300 ng de amostra de RNA. Os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS. #, $p < 0,05$ vs. grupo ZIKV como avaliado por ANOVA seguido do teste *post-hoc* Newmann-Keuls (A-B) ou teste de Mann-Whitney (C-D). Linhas pontilhadas em C e D indicam o limite de detecção da técnica de qRT-PCR.

Os efeitos do ADE na resposta inflamatória induzida pelo ZIKV nesses tecidos também foi investigada. Apesar de níveis similares dos mediadores inflamatórios CCL2, IFN- γ , IL-10, TGF- β e TNF terem sido encontrados nas placentas do grupo ZIKV em relação ao controle PBS, uma redução na concentração desses mediadores foi detectada nas placentas do grupo 4G2+ZIKV (Figura 19A-E). Outros mediadores como IL-6, CCL5, IL1- β , IFN- α e IFN- β não foram alterados ou detectados na placenta (Figura 19F-J)

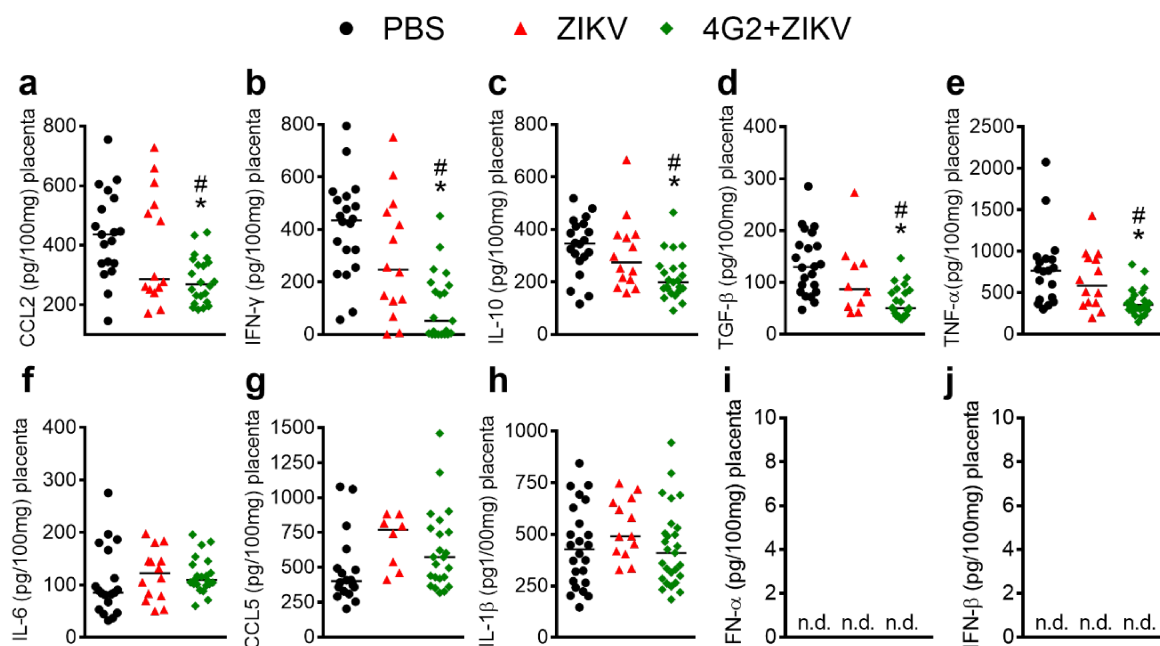


Figura 19: Avaliação das concentrações de mediadores inflamatórios na placenta após a infecção pelo ZIKV. Após as coletas no DE 15,5, as concentrações de mediadores inflamatórios na placenta foram determinadas por ELISA e expressas como picogramas por 100 mg de tecido. Os dados foram apresentados como mediana e os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS. #, $p < 0,05$ vs. grupo ZIKV como avaliado por ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

Interessantemente, a IL-6 foi aumentada no cérebro fetal do grupo 4G2+ZIKV, mas não nos animais ZIKV (Figura 20A). Enquanto níveis de CCL2, IL-10, IFN- γ e TGF- β foram reduzidos nos cérebros dos fetos do grupo ZIKV (Figura 20B-E), apenas as duas últimas citocinas também foram reduzidas no cérebro dos fetos 4G2+ZIKV (Figura 20D-E). Semelhante à placenta, alterações nos níveis de TNF, CCL5, IL1- β , IFN- α e IFN- β não foram observadas no cérebro da prole (Figura 20F-J). Portanto, a administração de doses subneutralizantes de anticorpos pan-flavivírus para fêmeas grávidas resultou em maior carga genômica viral, maior morte fetal e isso foi associado com uma hiporresponsividade à produção de CCL2, IFN- γ , IL-10, TGF- β e TNF na placenta.

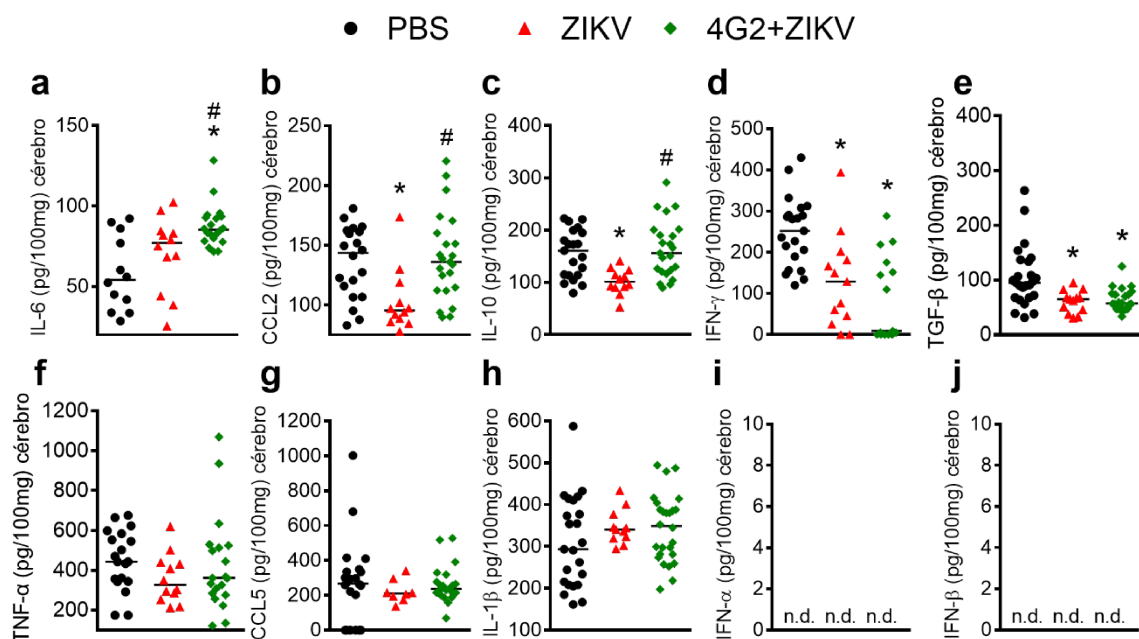


Figura 20: Avaliação das concentrações de mediadores inflamatórios no cérebro fetal após a infecção pelo ZIKV. Após as coletas no DE 15,5, as concentrações de mediadores inflamatórios no cérebro fetal foram determinadas por ELISA e expressas como picogramas por 100 mg de tecido. Os dados foram apresentados como mediana e os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. n.d., não detectado. *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS. #, $p < 0,05$ vs. grupo ZIKV como avaliado por ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

5.3) A infecção pelo Zika virus induz abnormalidades neuropatológicas na prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV

Uma vez que a infecção pelo ZIKV causa alterações a curto prazo na fêmea grávida e nos fetos em desenvolvimento, as consequências da infecção congênita pelo ZIKV a longo prazo da prole foram investigadas. Além disso, também foi investigado se o tratamento com 4G2 também poderia contribuir para a exacerbação das anormalidades de neurodesenvolvimento relacionadas à SCZ desde o nascimento até a idade adulta. Para isso, um protocolo experimental similar foi realizado como descrito anteriormente na Figura 11, sendo que o nascimento natural da prole foi permitido nesta etapa. No período pós-natal das proles, as análises ocorreram da 4^a semana até a 12^a semana de vida, quando os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados, como demonstrado na Figura 13. As próximas sessões descreverão as análises conduzidas na prole nascidas de mães infectadas pelo ZIKV na presença ou ausência de imunidade prévia anti-flavivirus.

As fêmeas grávidas foram monitoradas diariamente após a infecção pelo ZIKV por meio de pesagens e aparecimento de sinais clínicos (ex.: pelo eriçado, ataxia, fraqueza ou paralisia, parcial ou total, dos membros posteriores). Os resultados não mostraram alteração no ganho de peso (Figura 21A) ou aparecimento de sinais clínicos até o nascimento da prole entre todos os grupos avaliados. Em seguida, o número de filhotes vivos foi monitorado cuidadosamente uma vez por semana e a morte total ou parcial da ninhada foi considerada como uma morte pós-natal. Uma redução na sobrevivência da prole foi observada no grupo ZIKV (cerca de 11%) em comparação com os controles PBS (6%). Ainda, a morte fetal pós-natal aumentou para aproximadamente 26% na presença de anticorpos pan-flavivirus, como demonstrado no grupo 4G2+ZIKV (Figura 21B).

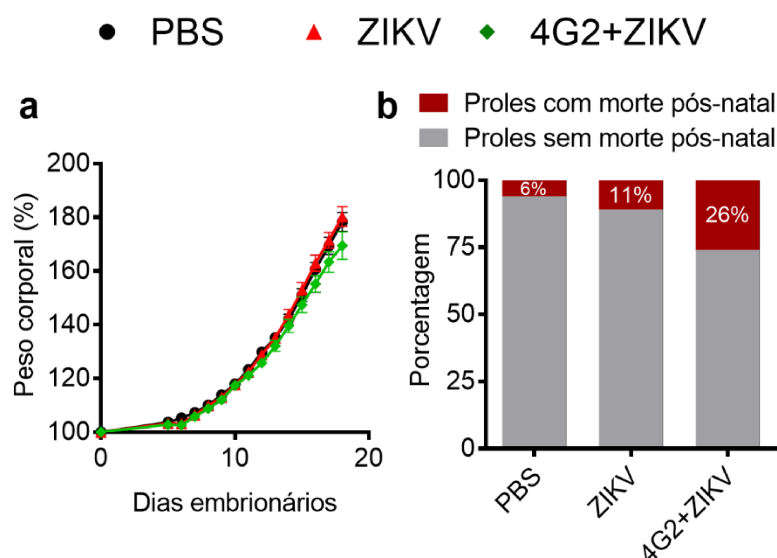


Figura 21: Peso corporal das fêmeas grávidas e sobrevivência da prole após o nascimento. As fêmeas grávidas foram pesadas diariamente após a infecção até o nascimento de seus filhotes (A). Após o nascimento, a morte pós-natal total ou parcial da prole foi registrada (B). Os dados de ganho de peso foram expressos como média \pm SEM, enquanto a morte pós-natal foi expressa como porcentagem de proles com evento de morte pós-natal.

O desenvolvimento cerebral dos animais fêmeas da prole foi acompanhado por imagens de ressonância magnética (MRI), através da mensuração do volume cerebral total da 4^a a 12^a semana de vida (Figura 22). Para certificar que diferenças entre os grupos não eram devidas ao desenvolvimento total do animal, cada camundongo foi pesado antes da aquisição das imagens em todos os tempos avaliados. Os resultados revelaram uma redução no peso corporal na 4^a semana de vida da prole nascida de

mães infectadas pelo ZIKV (ambos os grupos ZIKV e 4G2+ZIKV; Figura 22A), embora o volume cerebral nesse período foi similar entre os grupos (Figura 22B). Em seguida, na 8ª e 12ª semanas de vida, o peso corporal da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV se tornou similar aos controles PBS (Figura 22A). Entretanto, o cérebro desses camundongos não acompanhou o desenvolvimento total do corpo e alterações significativas no volume cerebral de ambos os grupos infectados foram observadas na 12ª semana quando comparadas com os controles PBS (Figura 22B). Não houve diferenças entre os grupos infectados, ZIKV e 4G2+ZIKV.

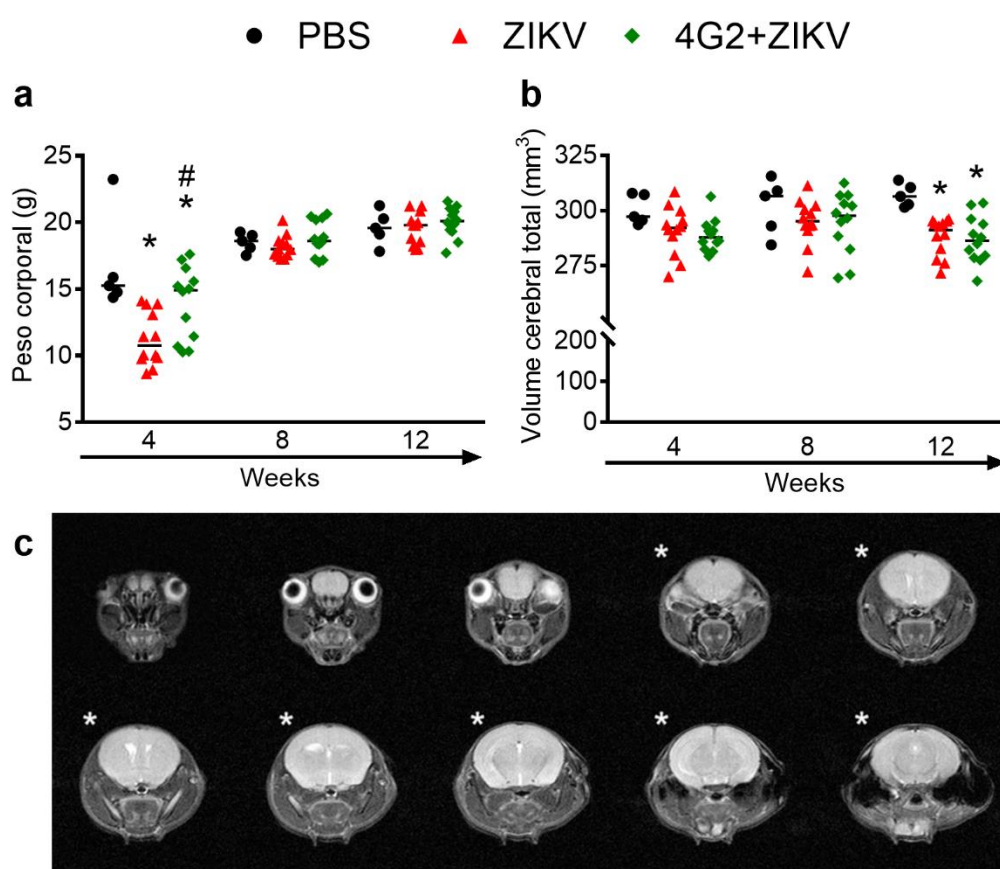


Figura 22: Análise de neurodesenvolvimento da prole após infecção materna pelo ZIKV. Os camundongos fêmeas da prole foram pesados (A) antes da aquisição de imagens de ressonância magnética (B-C) para quantificação do volume cerebral durante o seu desenvolvimento. O painel inferior (C) exemplifica as sete imagens (*) sequenciais utilizadas para a quantificação do volume cerebral, cujo resultado está representado no gráfico em B. Os resultados estão apresentados como mediana. Nos gráficos: *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS. #, $p < 0,05$ vs. grupo ZIKV como avaliado por *two-way* ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

É importante ressaltar que as análises de acompanhamento do desenvolvimento descritas acima foram realizadas na prole do sexo feminino (Figura

22), uma vez que os animais machos foram usados para as análises comportamentais descritas na Tabela 2. Por isso, esses animais machos foram submetidos às análises de MRI apenas na 12^a semana de vida, previamente à eutanásia para coleta de tecidos, sendo que resultados similares foram observados nesses animais (Figura 23). Assim, esses resultados indicam que a infecção pelo ZIKV durante a gravidez na presença ou não de anticorpos pan-flavivirus induz um déficit no crescimento inicial da prole que culmina com a redução do volume cerebral total relacionada à SCZ na idade adulta.

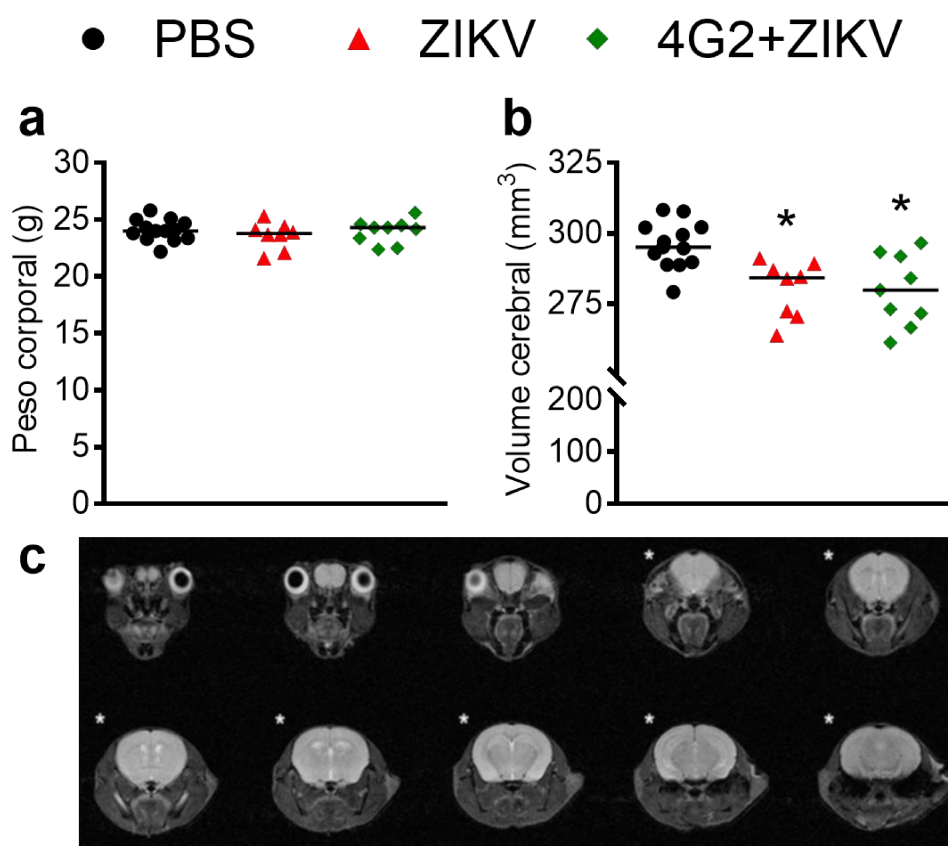


Figura 23: Análise de MRI do cérebro dos animais machos da prole com 12 semanas de idade. Os animais machos da prole foram pesados (A) e o volume cerebral foi quantificado por MRI (B-C) na 12^a semana de vida. O painel inferior (C) exemplifica as sete imagens (*) sequenciais utilizadas para a quantificação do volume cerebral, cujo resultado está representado no gráfico em B. Os dados foram representados como mediana. Nos gráficos: *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS como avaliado por *one-way* ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

Além da análise morfológica por MRI, em seguida, uma série de análises morfométricas e histopatológicas de fatias de cérebro da prole de 12 semanas de vida foi realizada (Figuras 24-28). As análises histopatológicas da prole adulta revelaram que não haviam alterações graves nos cérebros dos grupos ZIKV e 4G2+ZIKV em

comparação com os controles PBS (Figura 24). No entanto, quando o cérebro foi analisado em maiores detalhes utilizando técnicas de imuno-histoquímica, um aumento na neurodegeneração, como avaliado por coloração com Fluoro Jade C, foi observado nas amostras da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV (Figura 25), embora uma diferença entre os grupos ZIKV e 4G2+ZIKV não tenha sido observada. A quantificação de micróglia, astrócitos e neurônios foi realizada pela coloração por imuno-histoquímica e contagem de células positivas para Iba-1, S100 β e NeuN, respectivamente, no córtex cerebral. As contagens de micróglia (Figura 26) e astrócitos (Figura 27) foram similares entre os animais infectados e controle. Entretanto, uma redução nas contagens de neurônios NeuN+ no córtex da prole 4G2+ZIKV em comparação com os grupos ZIKV e PBS (Figura 28). Em conjunto, esses resultados mostram que a infecção materna pelo ZIKV leva a anormalidades neurológicas na prole na idade adulta, como demonstrado pela maior expressão de marcadores de neurodegeneração e redução do volume cerebral dos animais infectados. Além disso, a administração de 4G2 para mimetizar uma infecção secundária pelo ZIKV causou uma perda neuronal significativa além das alterações descritas anteriormente.

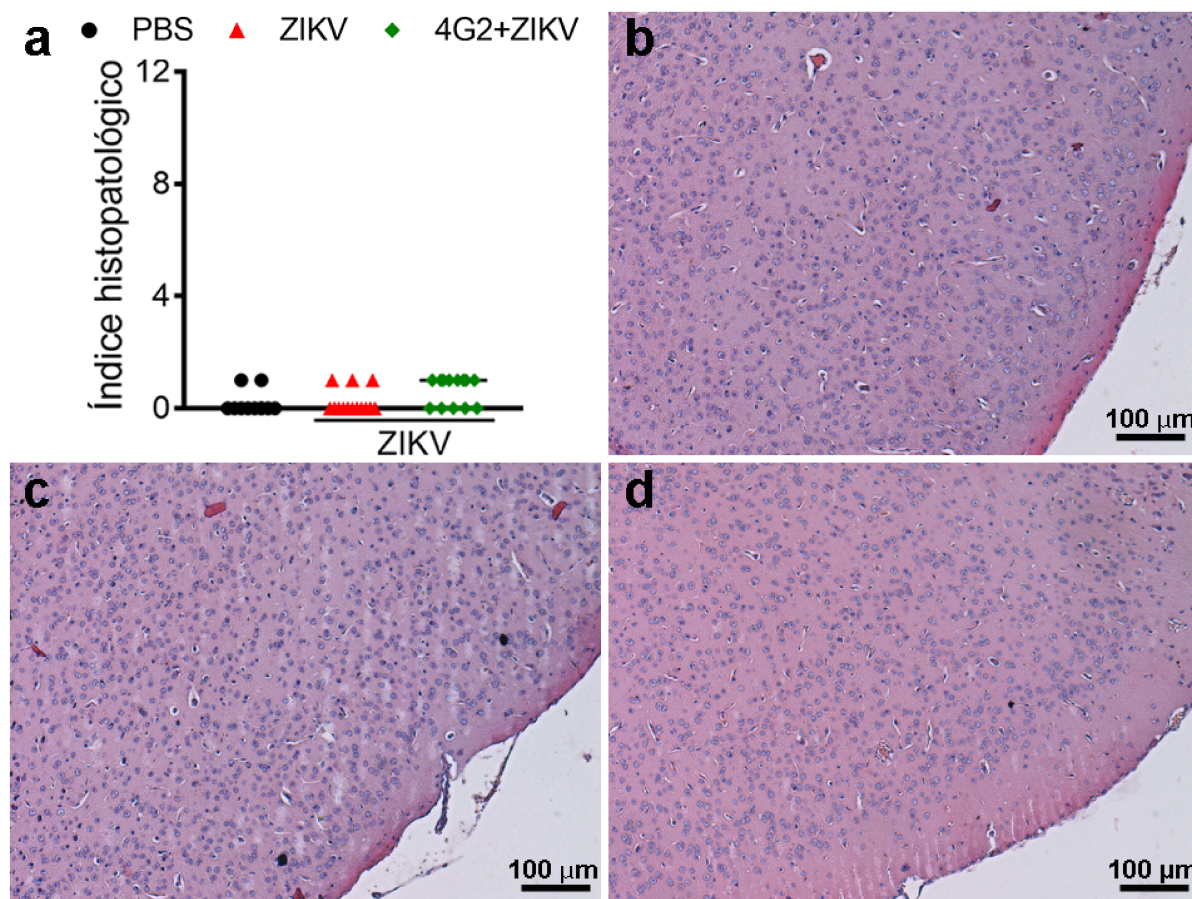


Figura 24: Análise histopatológica do cérebro da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Na 12^a semana de vida, os animais nascidos de mães infectadas e controles foram eutanasiados, seus cérebros coletados e corados por hematoxilina e eosina. O índice histopatológico do córtex cerebral, com valor máximo de 12, foi analisado por um patologista de maneira cega (A). As micrografias são imagens representativas dos grupos PBS (B), ZIKV (C) e 4G2+ZIKV (D). Magnificação X200. Barra de escala de 100 µm. Os resultados foram apresentados como mediana.

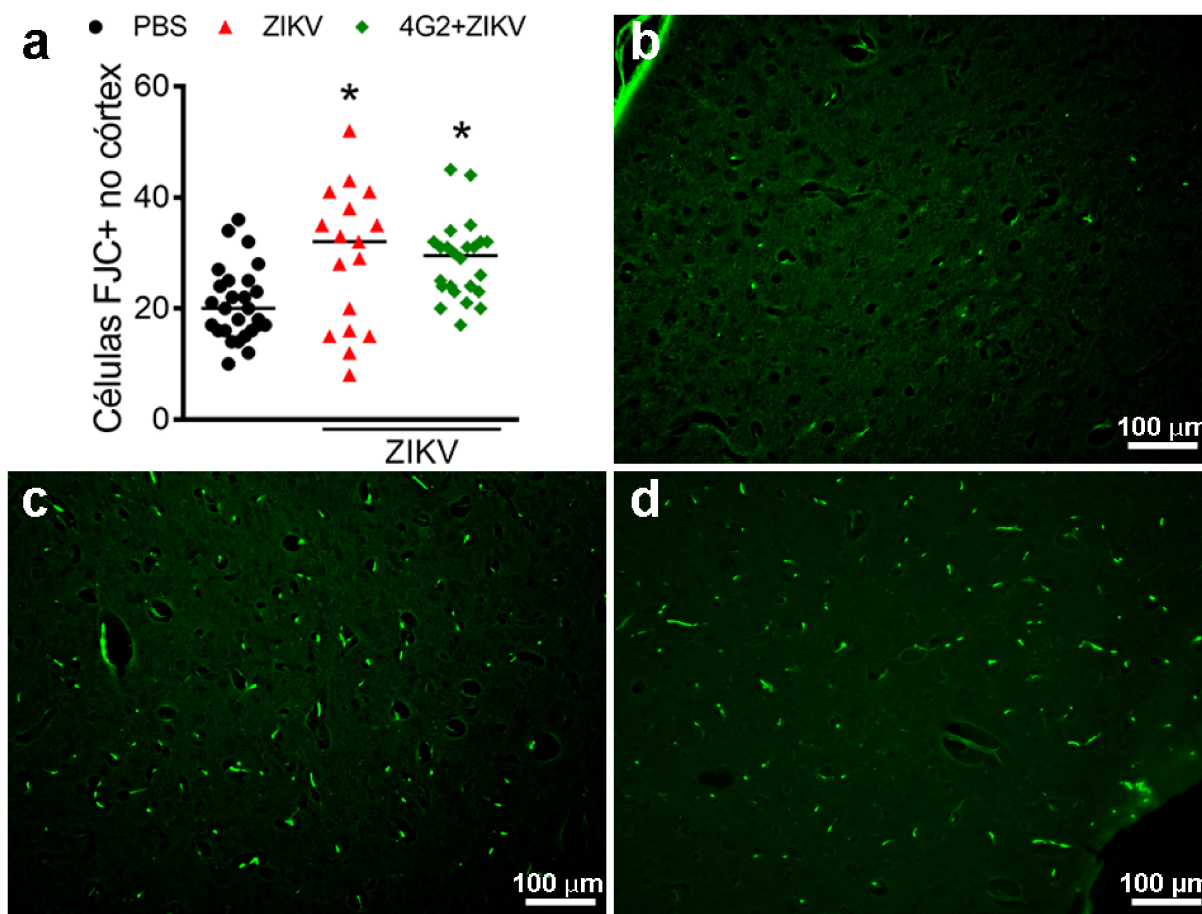


Figura 25: Análise de neurodegeneração no cérebro da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Na 12^a semana de vida, os animais nascidos de mães infectadas e controles foram eutanasiados, seus cérebros coletados e corados por Fluoro Jade C (FJC), que marca neurônios em neurodegeneração (A). As micrografias são imagens representativas dos grupos PBS (B), ZIKV (C) e 4G2+ZIKV (D). Células FJC+ no córtex cerebral foram contadas e os resultados foram apresentados como mediana. No gráfico: *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS como avaliado por *one-way* ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste. Magnificação X200. Barra de escala de 100 μ m.

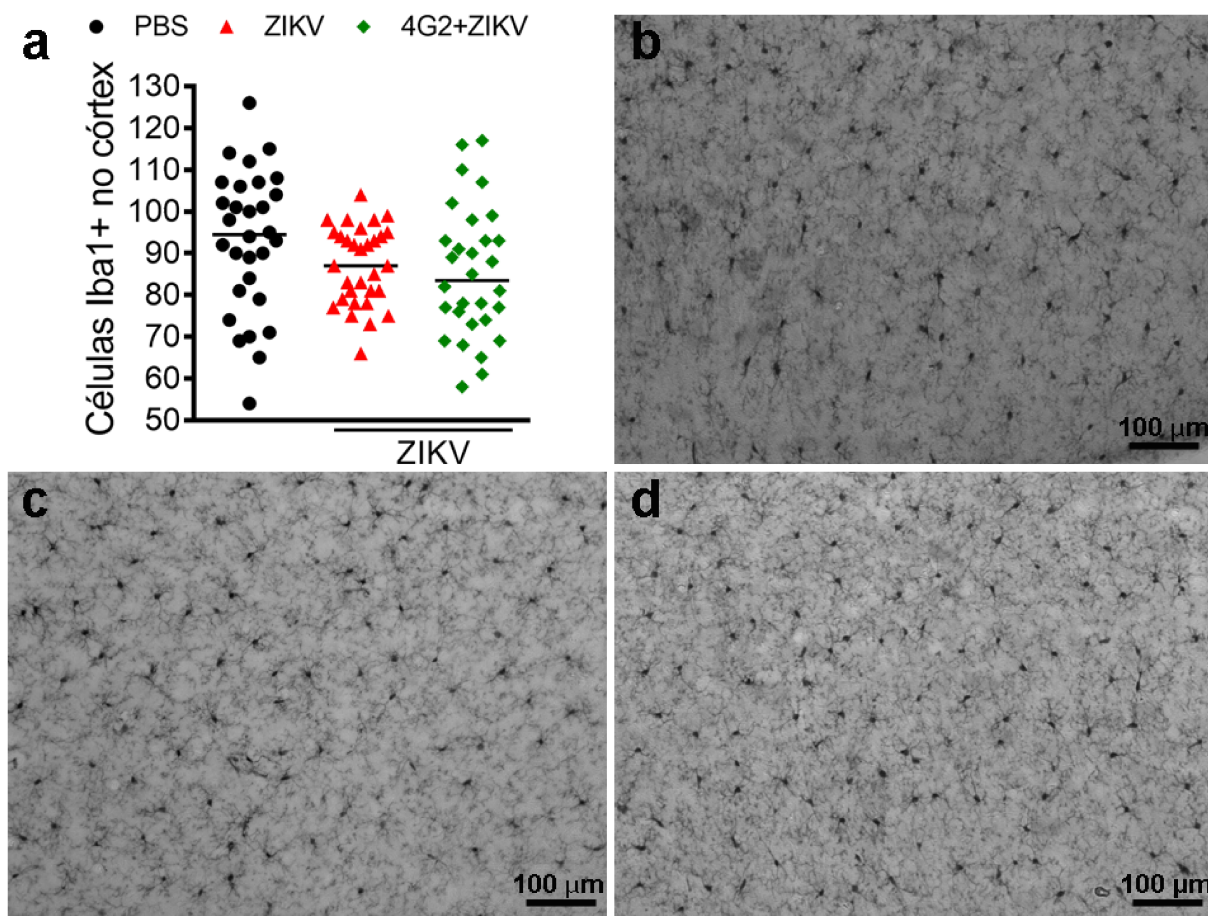


Figura 26: Contagem de micróglia no cérebro da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Na 12^a semana de vida, os animais nascidos de mães infectadas e controles foram eutanasiados, seus cérebros coletados e corados com anticorpos anti-Iba-1, que marca as células de micróglia (A). As micrografias são imagens representativas dos grupos PBS (B), ZIKV (C) e 4G2+ZIKV (D). Células Iba-1+ no córtex cerebral foram contadas e os resultados foram apresentados como mediana. Magnificação X200. Barra de escala de 100 μm .

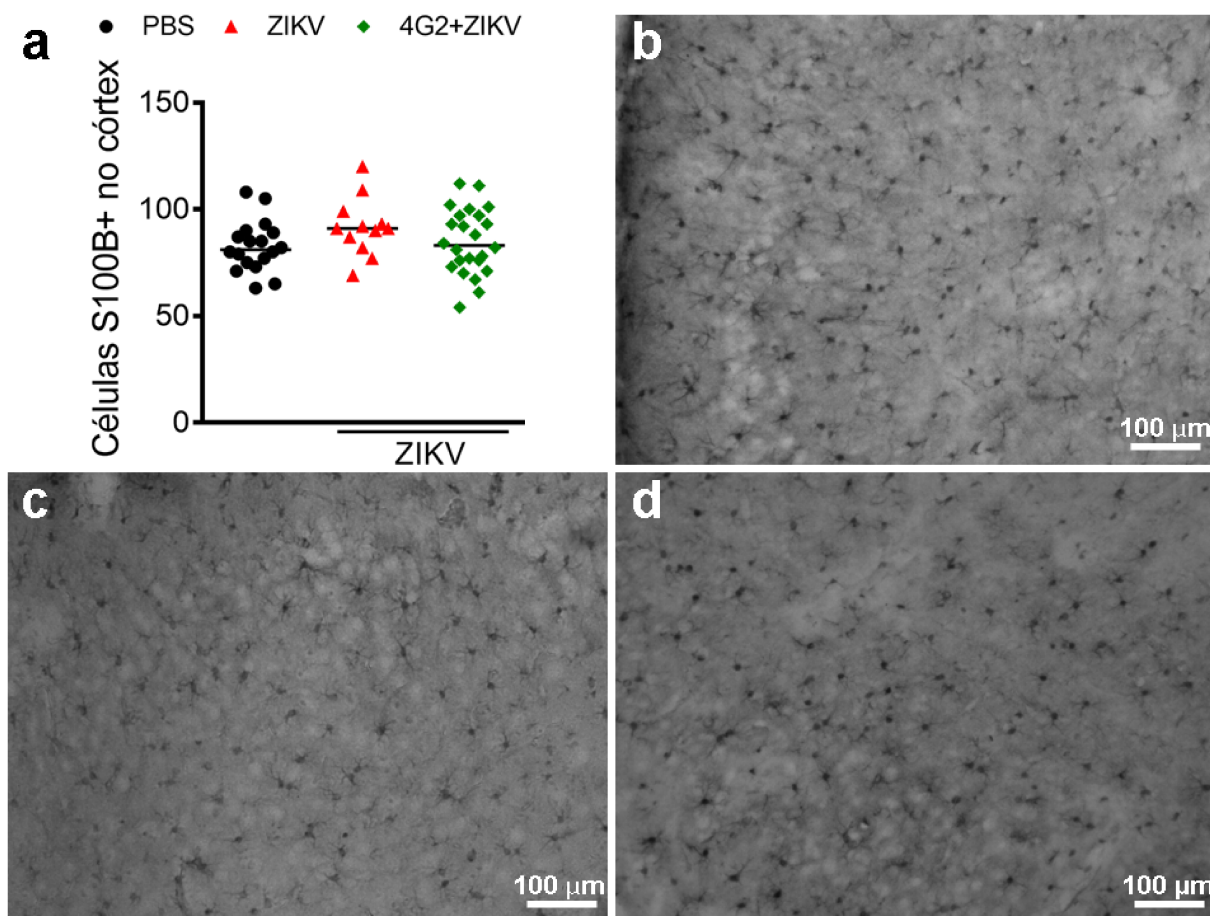


Figura 27: Contagem de astrócitos no cérebro da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Na 12^a semana de vida, os animais nascidos de mães infectadas e controles foram eutanasiados, seus cérebros coletados e corados com anticorpos anti-S100B, que marca astrócitos (A). As micrografias são imagens representativas dos grupos PBS (B), ZIKV (C) e 4G2+ZIKV (D). Células S100B+ no córtex cerebral foram contadas e os resultados foram apresentados como mediana. Magnificação X200. Barra de escala de 100 μ m.

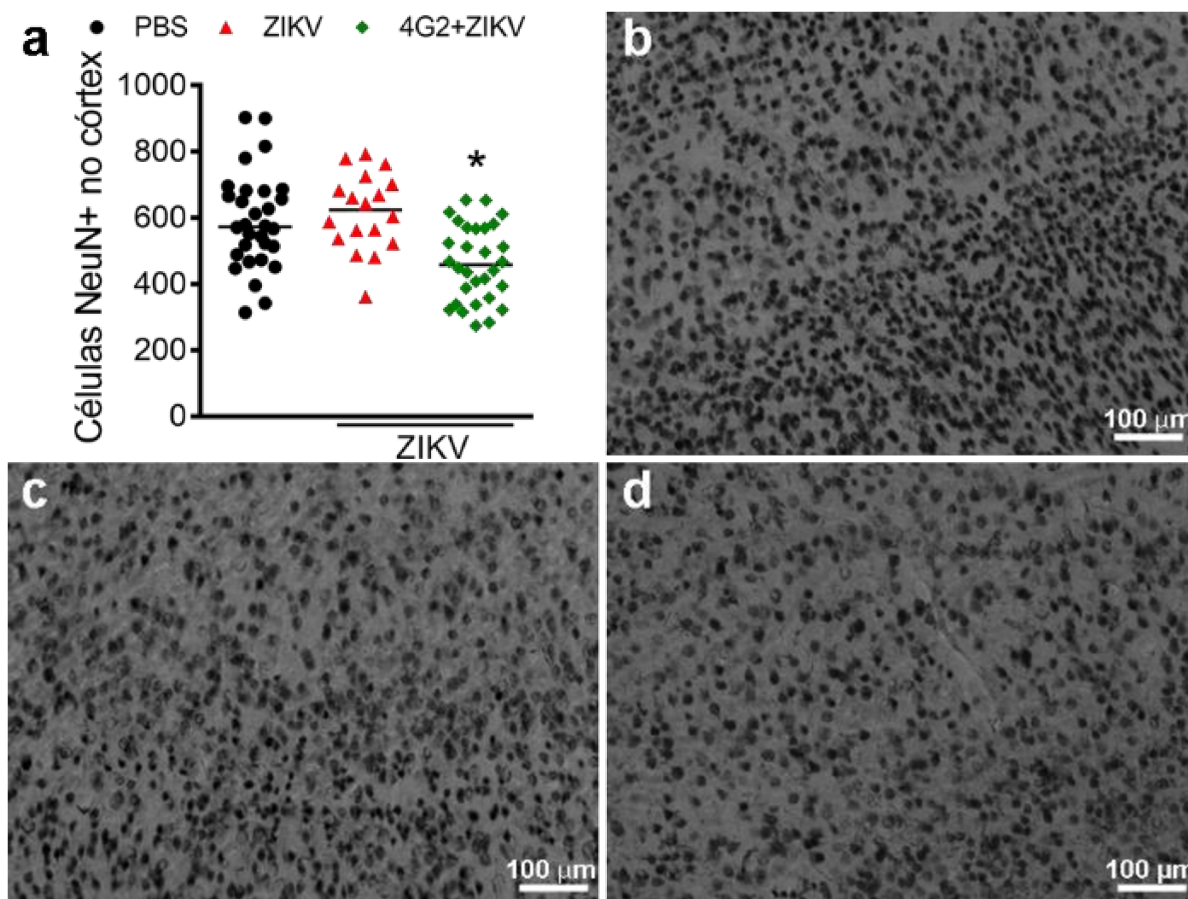


Figura 28: Contagem de neurônios no cérebro da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Na 12^a semana de vida, os animais nascidos de mães infectadas e controles foram eutanasiados, seus cérebros coletados e corados com anticorpos anti-NeuN, que marca neurônios (A). As micrografias são imagens representativas dos grupos PBS (B), ZIKV (C) e 4G2+ZIKV (D). Células NeuN+ no córtex cerebral foram contadas e os resultados foram apresentados como mediana. No gráfico: *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS como avaliado por *one-way* ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste. Magnificação X200. Barra de escala de 100 μm .

5.4) A infecção congênita pelo ZIKV não é associada com disfunções motoras e cognitivas da prole na vida adulta

Disfunções motoras e cognitivas de longo prazo induzidas pela infecção pelo ZIKV logo após o nascimento foram descritas recentemente por (NEM DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2018). Aqui, as consequências a longo prazo da infecção pelo ZIKV foram avaliadas na prole adulta nascida de mães infectadas durante o período gestacional. Para isto, uma série de testes comportamentais foram realizados nos animais machos da prole entre a 8^a e 12^a semana de vida. Os resultados foram sumarizados na Tabela 2. Resultados similares entre todos os grupos foram encontrados para os testes de cognição avaliando a sociabilidade (teste de

sociabilidade), ansiedade (testes do labirinto em cruz elevado e do campo aberto) e memória de trabalho (labirinto em Y). Análises adicionais também demonstraram ausência de comportamentos associados à disfunção motora (teste do campo aberto) e à depressão (teste de preferência a sacarose) nos grupos ZIKV e 4G2+ZIKV em comparação com os controles PBS, como demonstrado pela redução, embora não significativa, da locomoção basal ($p=0,0693$ 4G2+ZIKV vs. PBS) e da preferência à sacarose ($p=0,0827$ 4G2+ZIKV vs. PBS), respectivamente. Esses resultados sugerem que apenas a infecção congênita pelo ZIKV em camundongos imunocompetentes, mesmo na presença de 4G2, não foi suficiente para induzir alterações comportamentais na prole adulta no nosso modelo experimental.

Tabela 2. Análise comportamental realizada com animais machos da prole de fêmeas grávidas controle ou infectadas pelo ZIKV que receberam ou não 4G2.

Teste comportamental	Indicativo	Parâmetro	Média ± desvio padrão		
			PBS	ZIKV	4G2+ZIKV
Interação social	Reconhecimento social	Índice de sociabilidade	59,6±1,8	63,2±2,1	58,6±2,5
		Tempo nos braços abertos	59,7±5,9	62,6±6,4	68,4±5,8
Labirinto em cruz elevado	Ansiedade	Tempo nos braços fechados	209,2±7,7	208,7±8,4	201,3±7,4
		Entradas nos braços abertos	15±1,5	12,9±0,9	14,4±1,4
		Entradas nos braços fechados	26±1,9	21,7±1,5	22,6±1,4
		Alternância entre os braços	59,8±2,0	63,7±1,8	63,3±1,6
Campo aberto	Atividade locomotora e ansiedade	Locomoção basal	40,0±1,7	36,1±1,9	35,5±1,7
		Entradas no centro	95,7±6,0	84,2±5,7	86,4±5,7
		Tempo no centro	154,3±16,2	141,7±15,2	143,7±13,0
Preferência a sacarose	Depressão	Preferência a sacarose no dia 1	66,6±4,2	65,2±3,2	57,2±2,2
		Preferência a sacarose no dia 2	46,8±4,2	52,9±3,9	55,8±2,7

*Nenhuma das alterações descritas acima foram estatisticamente significantes.

5.5) A infecção congênita pelo ZIKV resulta em anormalidades oftalmológicas na prole

As anormalidades oftalmológicas induzidas pelo ZIKV foram reportadas experimentalmente (MINER et al., 2016a) e em bebês nascidos de mães infectadas (VENTURA et al., 2016a). Aqui, a contribuição dos anticorpos pan-flavivirus na exacerbação dessas alterações oftalmológicas foi avaliada durante a vida da prole nascida de fêmeas infectadas. Como um meio para avaliar alterações oftalmológicas induzidas pela infecção pelo ZIKV, os camundongos foram submetidos a avaliação da pressão intraocular (PIO), semanalmente, da 4ª a 12ª semana de vida, (Figura 29). Enquanto a prole nascida de animais controle PBS apresentaram valores de PIO variando entre $17,2 \pm 2,8$ mmHg no primeiro tempo avaliado (entre 4ª e 5ª semana) a $17,1 \pm 3,1$ mmHg na última medida (entre 11ª e 12ª semana), o grupo ZIKV mostrou um leve aumento nos valores de PIO, variando entre $18,2 \pm 3,6$ mmHg inicialmente e $19,3 \pm 3,7$ mmHg no último tempo medido. Camundongos do grupo 4G2+ZIKV apresentaram valores de PIO ainda maiores em todos os tempos avaliados, nos quais variaram de $24,0 \pm 4,3$ a $26,1 \pm 3,8$ mmHg da primeira à última análise, respectivamente (Figura 29).

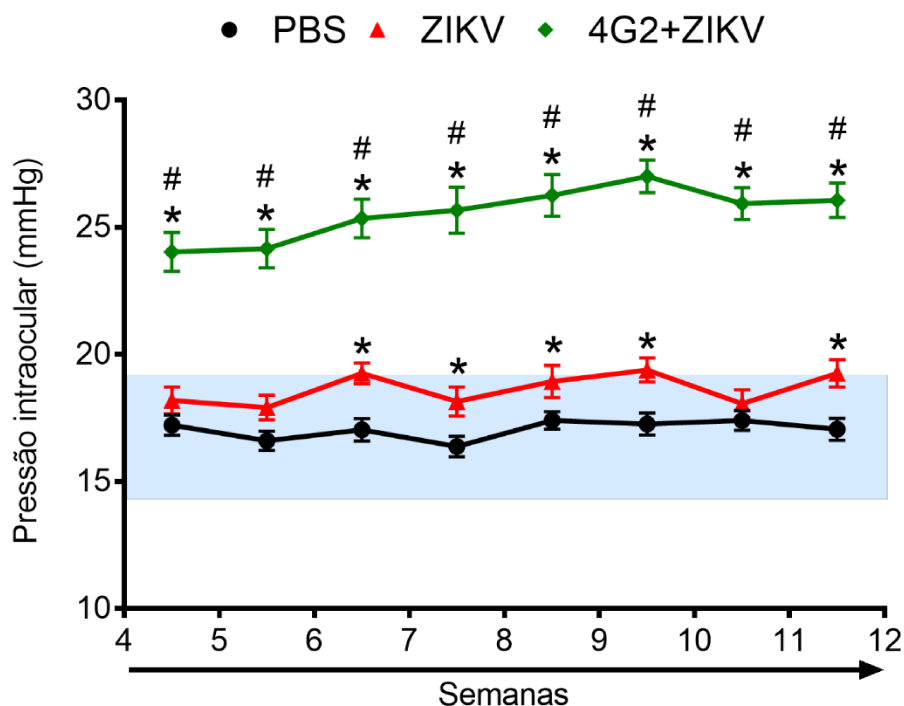


Figura 29: Avaliação da pressão intraocular da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Após o nascimento dos animais de mães infectadas ou controle, a pressão intraocular (PIO) da prole foi mensurada semanalmente da 4ª a 12ª semana de vida da prole (A). Os dados foram expressos como média \pm SEM. *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS. #, $p < 0,05$ vs. grupo ZIKV como avaliado por two-way ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

Considerando os valores anormais de PIO detectados em ambos os grupos infectados, ZIKV e 4G2+ZIKV, o que sugere um possível dano à visão dos animais, os olhos destes foram coletados na 12^a semana de vida para contagem de células ganglionares da retina (CGR; Figura 30). Embora contagens de CGR dos animais PBS e ZIKV apresentaram números similares, o número de CGR foi significativamente reduzido no grupo 4G2+ZIKV quando comparados com os controles PBS. Em seguida, para verificar um possível mecanismo de morte celular dessas CGR, a coloração de caspase-3 ativada foi realizada por imuno-histoquímica (Figura 31). Similarmente, os resultados mostraram um aumento na contagem de células caspase-3 positivas no grupo 4G2+ZIKV em comparação com ambos os grupos ZIKV e PBS. Além disso, foi observado que alguns animais do grupo 4G2+ZIKV apresentaram sinais de conjuntivite e microftalmia. Em conjunto, esses dados mostraram que a infecção pelo ZIKV durante a gravidez causa anormalidades oftalmológicas na prole adulta e que elas são exacerbadas na presença de anticorpos 4G2.

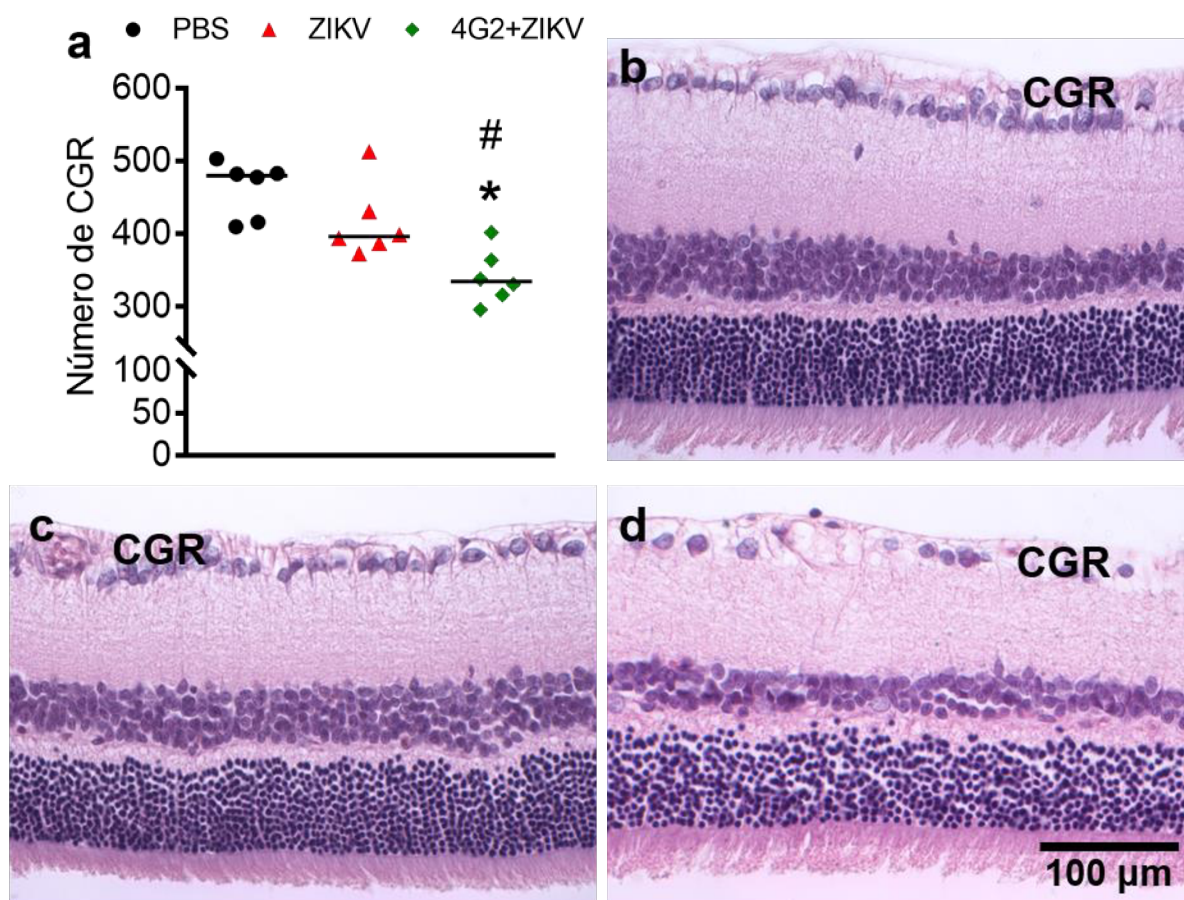


Figura 30: Contagem de células ganglionares da retina da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Na 12^a semana de vida, os animais foram eutanasiados, os olhos enucleados e corados por hematoxilina e eosina para contagem de Células Ganglionares da Retina (CGR) (A). Nas imagens representativas de retinas dos grupos PBS (B), ZIKV (C) e

4G2+ZIKV (D), a camada de CGR é especificada em cada foto. Magnificação X400. Barra de escala de 100 μm . Os resultados foram representados como mediana. *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS. #, $p < 0,05$ vs. grupo ZIKV como avaliado por ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

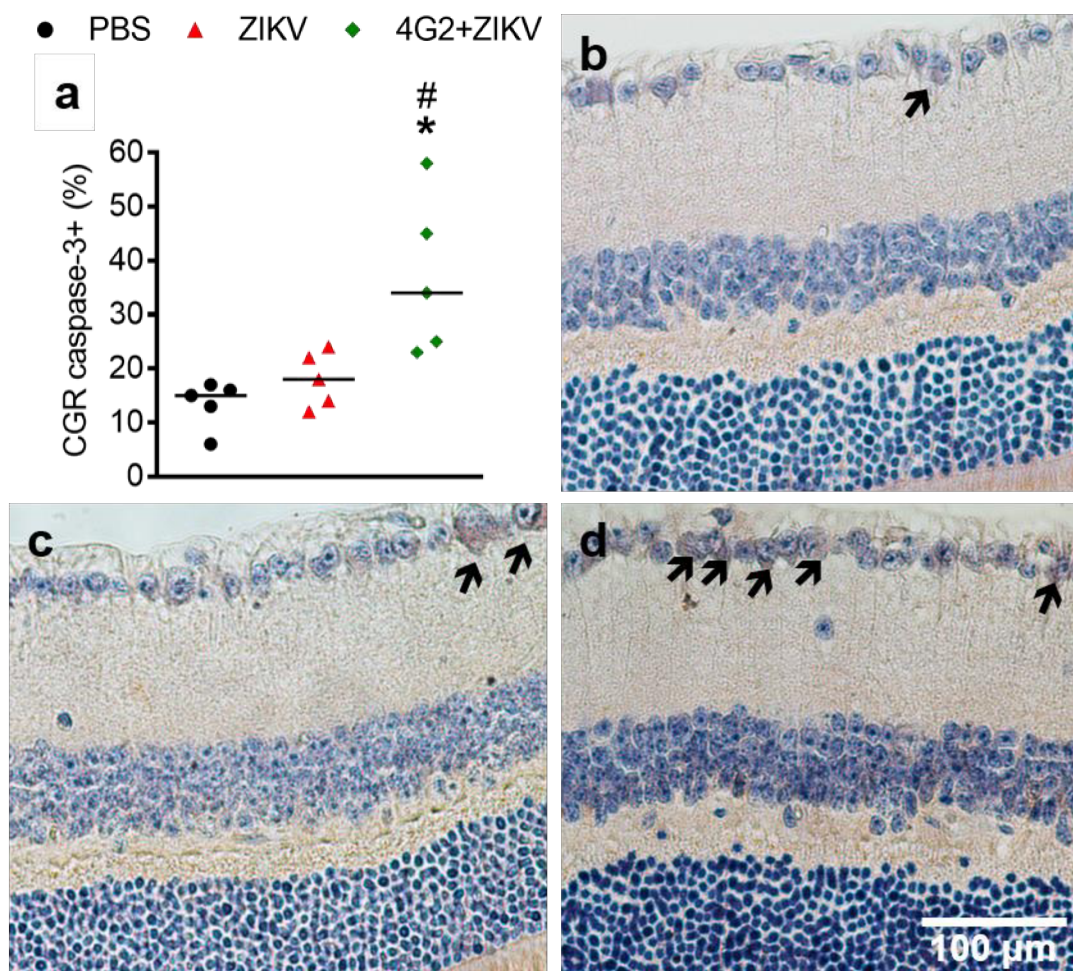


Figura 31: Avaliação da apoptose de células ganglionares da retina da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Na 12ª semana de vida, os animais foram eutanasiados, os olhos enucleados e corados por imuno-histoquímica usando anticorpos anti-caspase-3 ativada. Nas imagens representativas de retinas dos grupos PBS (B), ZIKV (C), 4G2+ZIKV (D), a camada de CGR é especificada em cada foto e as células caspase-3 positivas são indicadas por setas. Magnificação X400. Barra de escala de 100 μm . Os resultados foram representados como mediana. *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS. #, $p < 0,05$ vs. grupo ZIKV como avaliado por ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

5.6) A infecção congênita pelo ZIKV resulta em alterações morfológicas testiculares da prole adulta

Estudos recentes têm gerado preocupação relacionada a transmissão sexual do ZIKV e suas implicações no trato reprodutivo masculino (MA et al., 2016; MATUSALI et al., 2018). No entanto, os efeitos a longo prazo da infecção congênita

pelo ZIKV no trato reprodutivo masculino ainda precisam ser investigados. Então, os efeitos da infecção congênita pelo ZIKV na morfologia dos testículos (Figura 32) foram investigados na prole adulta e se a administração de 4G2 poderia contribuir para a exacerbação dessas alterações.

A infecção congênita pelo ZIKV induziu alterações morfológicas e biométricas nos compartimentos tubulares dos testículos da prole adulta nascida de mães infectadas pelo ZIKV e algumas delas ainda foram exacerbadas na presença de doses subneutralizantes do anticorpo 4G2 (Figura 32-34). Embora diferenças macroscópicas ou no peso dos testículos da prole de mães infectadas ou controles não tenham sido encontradas (Figura 34A), uma redução significativa na densidade dos componentes testiculares, como volume de componentes dos túbulos seminíferos (Figura 34B), diâmetro tubular (Figura 34C) e lúmen tubular (Figura 34D), foram detectadas nos grupos ZIKV quando comparados ao controle PBS e também no grupo 4G2+ZIKV em relação aos grupos ZIKV e PBS. De fato, ambos os grupos ZIKV e 4G2+ZIKV apresentaram importantes alterações morfológicas nos túbulos seminíferos quando comparados aos controles (Figura 32B1 e C1; Figura 34E). Cerca de 40% dos túbulos seminíferos apresentaram alguma característica alterada, como demonstrado pela degeneração do epitélio seminífero, ausência de alguns tipos de células germinativas e retenção de corpos residuais (Figura 32B2 e C2; Figura 34F). Ainda, a eficiência das células de Sertoli, estimada pelo número de espermátides circulares por célula de Sertoli, foi menor no grupo 4G2+ZIKV (Figura 34G). O índice meiótico, medido pelo número de espermátides circulares produzidas por espermatócitos em paquíteno (Figura 34H), também foi reduzido em ambos os grupos infectados quando comparados ao controle. De acordo, uma maior frequência de apoptose de células germinativas (células caspase-3 positivas – Figura 33) por área de epitélio seminífero foi detectada no grupo apenas infectado por ZIKV (Figura 33B; Figura 34I). O grupo 4G2+ZIKV também apresentou uma maior taxa de células apoptóticas por área, mas não estatisticamente diferente do grupo controle (Figura 33C; Figura 34I).

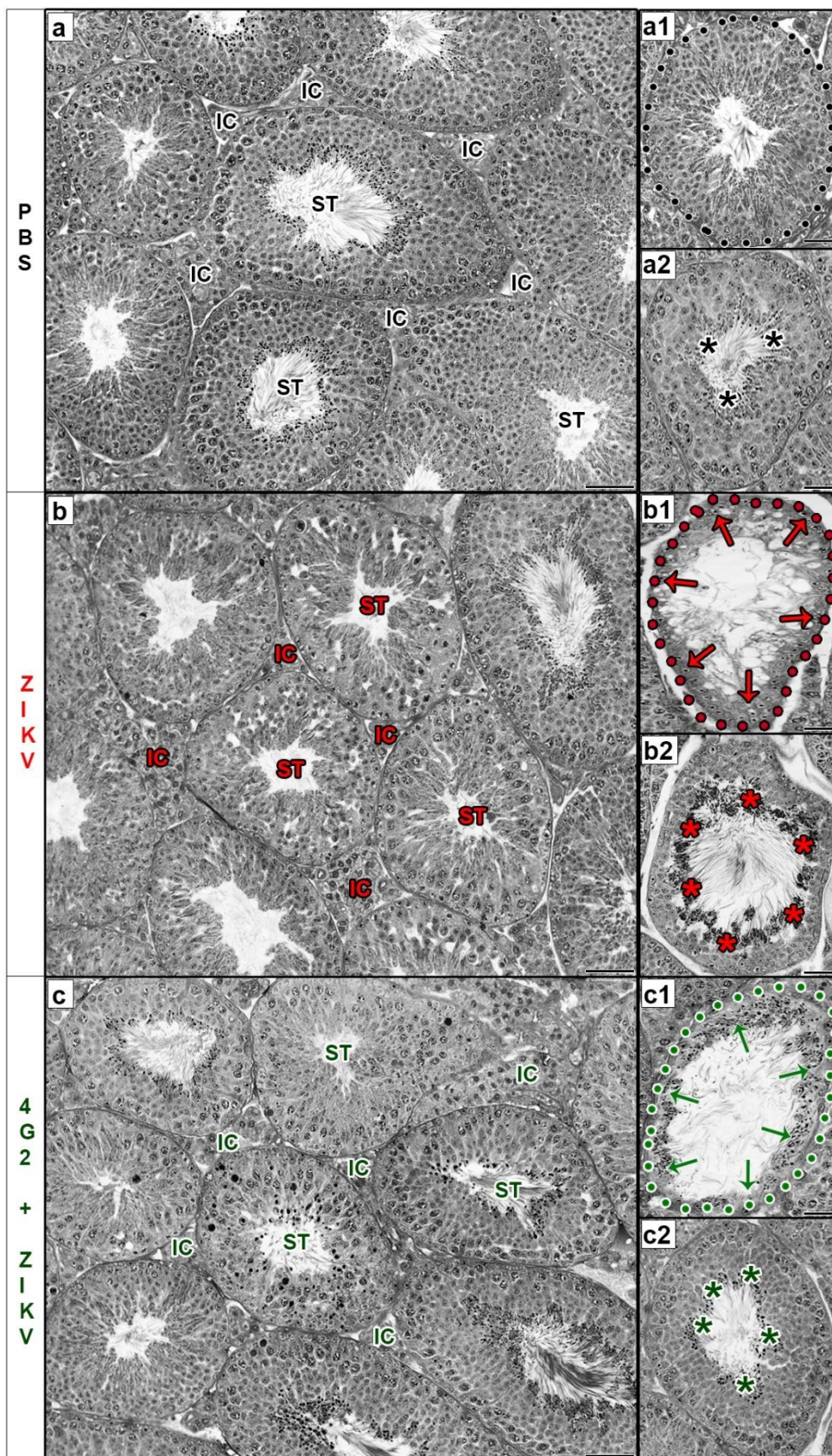


Figura 32: Micrografias dos compartimentos tubulares dos testículos da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Na 12^a semana de vida, os animais nascidos de mães infectadas e controles foram eutanasiados. Após orquiectomia, micrografias dos compartimentos tubulares dos testículos dos grupos controle PBS (A, A1 e A2), ZIKV (B, B1

e B2) e 4G2+ZIKV (C, C1 e C2) foram obtidas para realização de análises morfométricas. Nas imagens: compartimento intersticial (IC em A-C) secções (linha pontilhada em A1-C1) de túbulos seminíferos (ST em A-C); degeneração do epitélio seminífero (setas em B2 e C2); retenção de corpos residuais (asteriscos em B2 e C2); Magnificação = 200X (A-C) e 400X (A1-C1, A2-C2). Barra de escala (linhas pretas) = 50 μ m (A-C); 20 μ m (A1-C1, A2-C2).

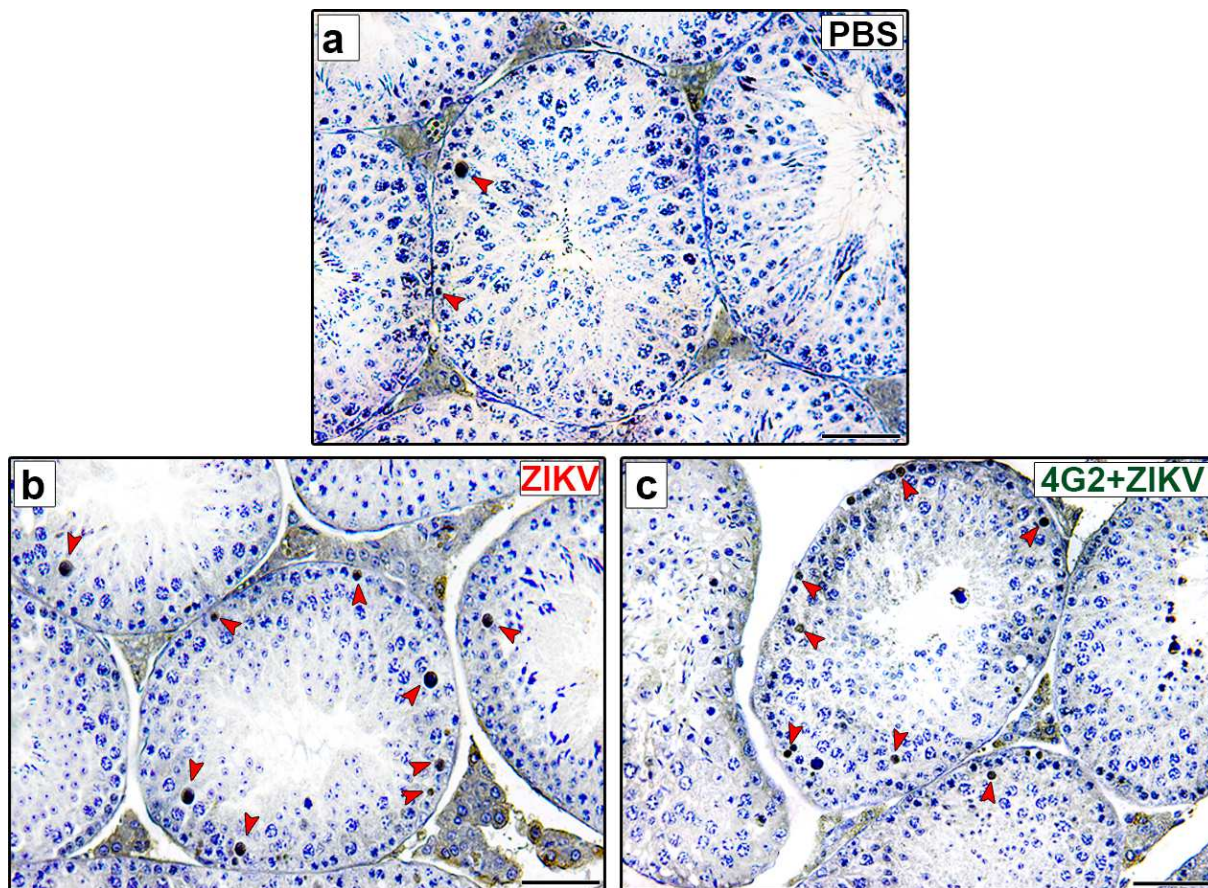


Figura 33: Imuno-histoquímica de caspase-3 dos compartimentos tubulares dos testículos da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Na 12ª semana de vida, os animais nascidos de mães infectadas e controles foram eutanasiados. Após orquiectomia, secções dos compartimentos tubulares dos testículos dos grupos controle PBS (A), ZIKV (B) e 4G2+ZIKV (C) foram coradas com anticorpos anti-caspase-3 para avaliação de apoptose, indicada pelas pontas de seta vermelhas nas imagens. Magnificação: 200X. Barra de escala (linhas pretas) = 50 μ m

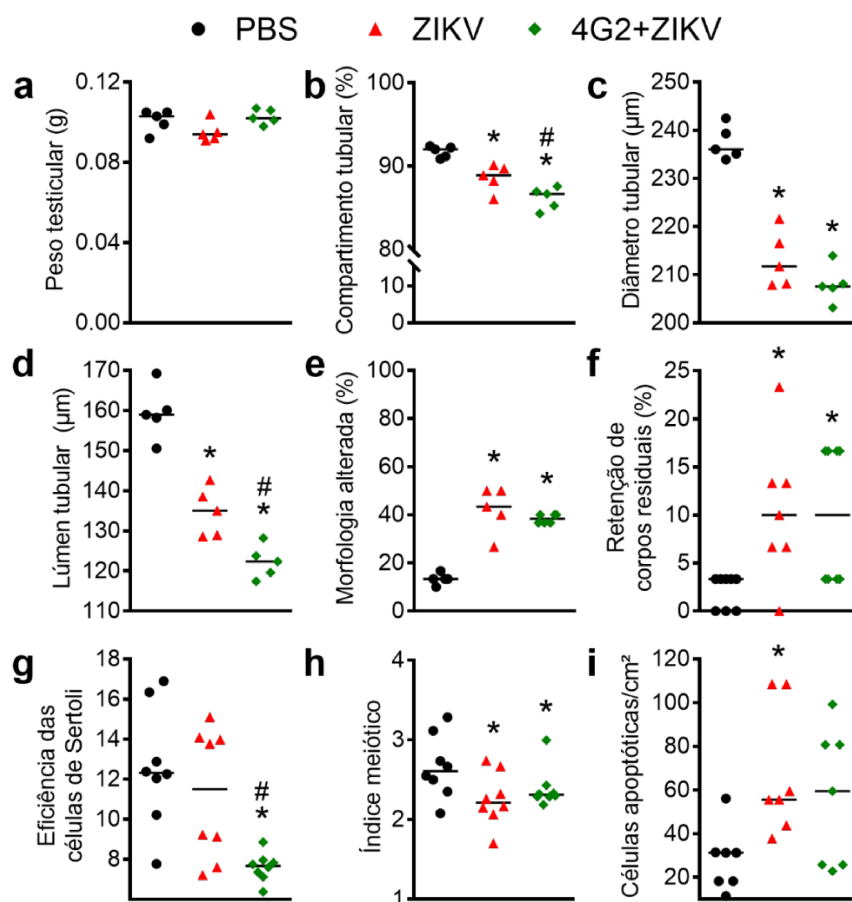


Figura 34: Análise morfométrica dos compartimentos tubulares dos testículos da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Após pesagem dos testículos (A), análises morfométricas foram realizadas a partir das imagens obtidas a fim de avaliar os seguintes parâmetros: proporção dos compartimentos tubulares (B); diâmetro tubular (C); lúmen tubular (D); alterações morfológicas significativas de secções dos túbulos seminíferos (E), como degeneração do epitélio seminífero, ausência de algumas linhagens de células germinativas e aumento da retenção de corpos residuais (F); eficiência de células de Sertoli (G); índice meiótico (H); células caspase-3 positivas por área de epitélio seminífero (I). Os resultados foram expressos como mediana. Nos gráficos: *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS. #, $p < 0,05$ vs. grupo ZIKV como avaliado por ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

Por fim, as análises intertubulares dos testículos mostraram que não ocorreram alterações significativas nos vasos sanguíneos e nas células de Leydig (Figura 35-36). Assim, a infecção congênita pelo ZIKV induz alterações biométricas e morfológicas nos compartimentos tubulares dos testículos da prole adulta nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Algumas alterações ainda foram exacerbadas pelo tratamento com doses subneutralizantes de anticorpos 4G2. No geral, os resultados mostram que a infecção congênita pelo ZIKV induz orquite, na qual pode contribuir para o desenvolvimento de infertilidade masculina na prole adulta.

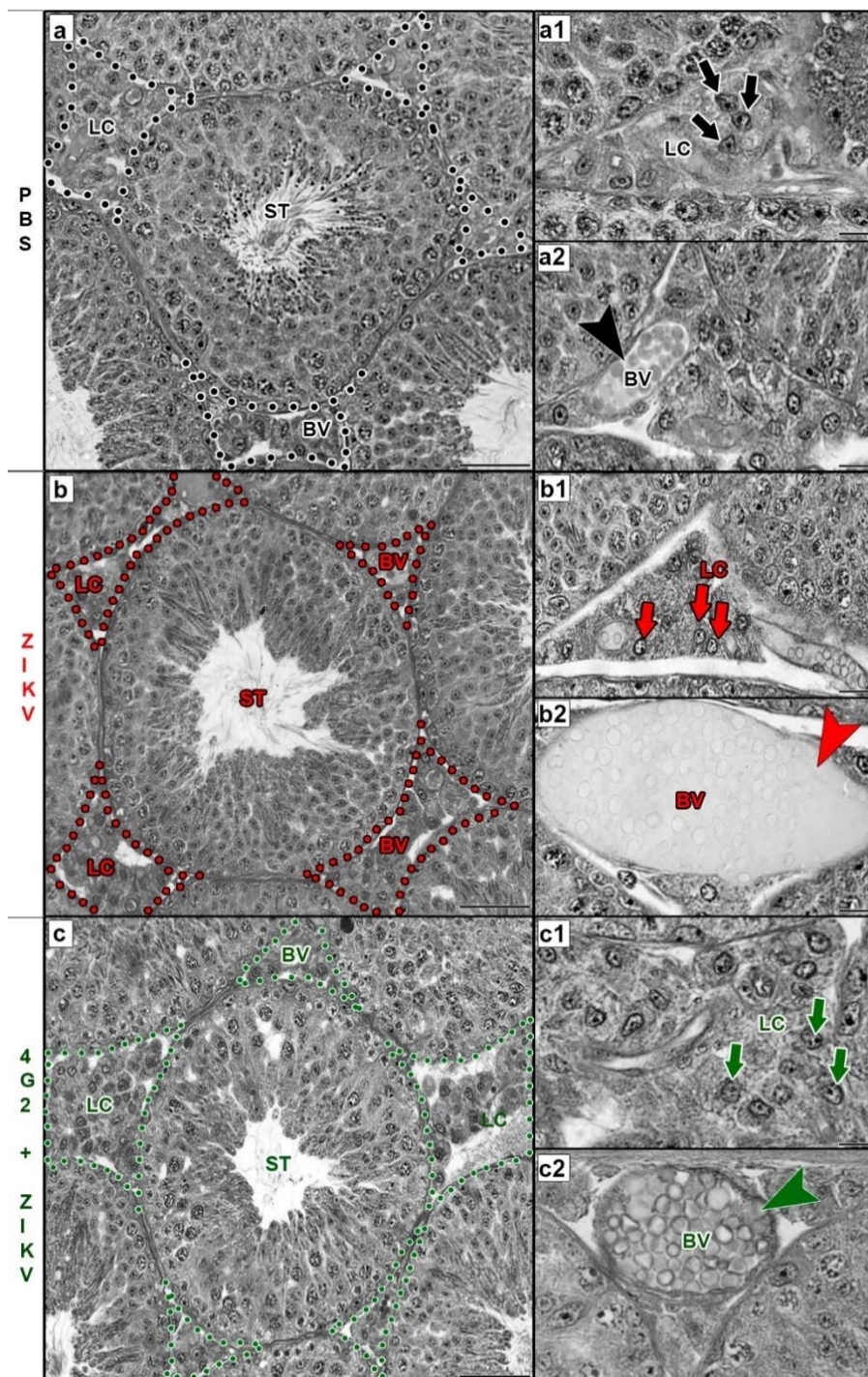


Figura 35: Micrografias dos compartimentos intertubulares dos testículos da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Na 12^a semana de vida, os animais nascidos de mães infectadas e controles foram eutanasiados. Após orquiectomia, micrografias dos compartimentos intertubulares dos testículos dos grupos controle PBS (A, A1 e A2), ZIKV (B, B1 e B2) e 4G2+ZIKV (C, C1 e C2) foram obtidas para realização de análises morfométricas. Nas imagens: compartimento intertubular (linha pontilhada em A-C); túbulos seminíferos (ST em A-C); células de Leydig (LC em A-C; setas em A1-C1); vasos sanguíneos (BV em A-C e pontas de seta em A1-C1). Magnificação = 200X (A-C) e 400X (A1-C1, A2-C2). Barra de escala (linhas pretas) = 50 μ m (A-C); 20 μ m (A1-C1, A2-C2).

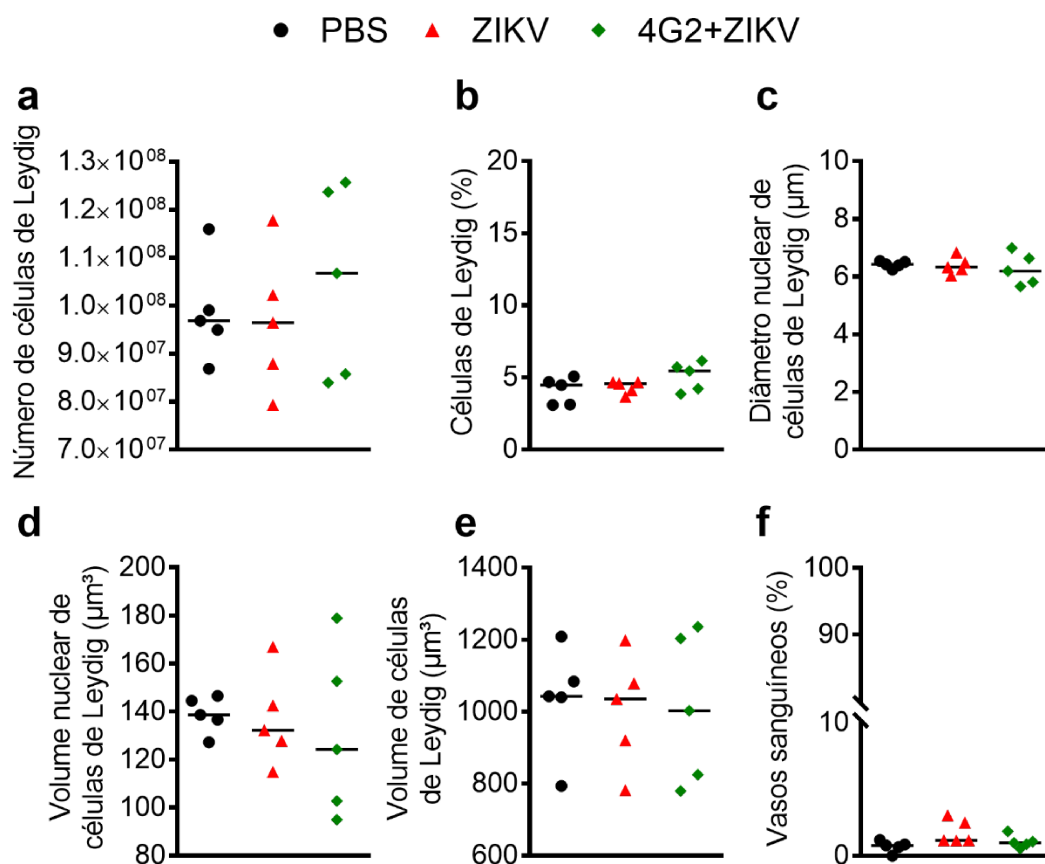


Figura 36: Análise morfométrica dos compartimentos intertubulares dos testículos da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. A partir das imagens obtidas, diferentes parâmetros morfológicos em relação as células de Leydig (A-E) e densidade volumétrica de vasos sanguíneos (F) foram avaliados. Os resultados foram expressos como mediana.

5.7) A infecção congênita pelo ZIKV afeta a qualidade óssea da prole adulta

Diversos estudos têm reportado o extensivo tropismo do ZIKV para diversos tipos celulares, incluindo células da pele (fibroblastos, queratinócitos epidérmicos e células de Langerhans), neurônios e células do trato reprodutivo. Esse tropismo é acompanhado pela detecção do ZIKV em diversos fluidos corporais, como urina, lágrimas, saliva e sêmen. (ROIMICHER et al., 2017) detectaram o genoma do ZIKV no fluido sinovial do joelho de uma mulher infectada pelo vírus, sugerindo que o ZIKV também poderia infectar diretamente os tecidos osteoarticulares e contribuir para o estabelecimento de sintomas relacionados às articulações (ROIMICHER et al., 2017). Então, os efeitos da infecção congênita pelo ZIKV na microarquitetura óssea dos camundongos adultos foram avaliados nesse trabalho.

Os fêmures da prole adulta nascida de fêmeas grávidas injetadas com PBS, ZIKV e 4G2+ZIKV foram coletados e analisados por microtomografia computadorizada (MicroCT; Figura 37). Os resultados demonstraram que a infecção pelo ZIKV, na presença ou ausência do anticorpo 4G2, induziu uma perda óssea marcante no fêmur dos animais adultos, como mostrado pela redução significativa de alguns parâmetros morfométricos ósseos, como densidade mineral óssea (BMD; Figura 37B), fração do volume ósseo trabecular, que é a porcentagem de volume ósseo trabecular por volume total do tecido ósseo, (BV/TV%; Figura 37C), espessura trabecular (Tb.Th; Figura 37D), número de trabéculas (Tb.N; Figura 37E) e aumento no índice de modelo estrutural (SMI; Figura 37G) quando comparados aos controles PBS. Essas alterações foram comparáveis entre os grupos ZIKV e 4G2+ZIKV. Diferenças na separação trabecular (Tb.Sp) não foram encontradas entre os grupos avaliados (Figura 37F).

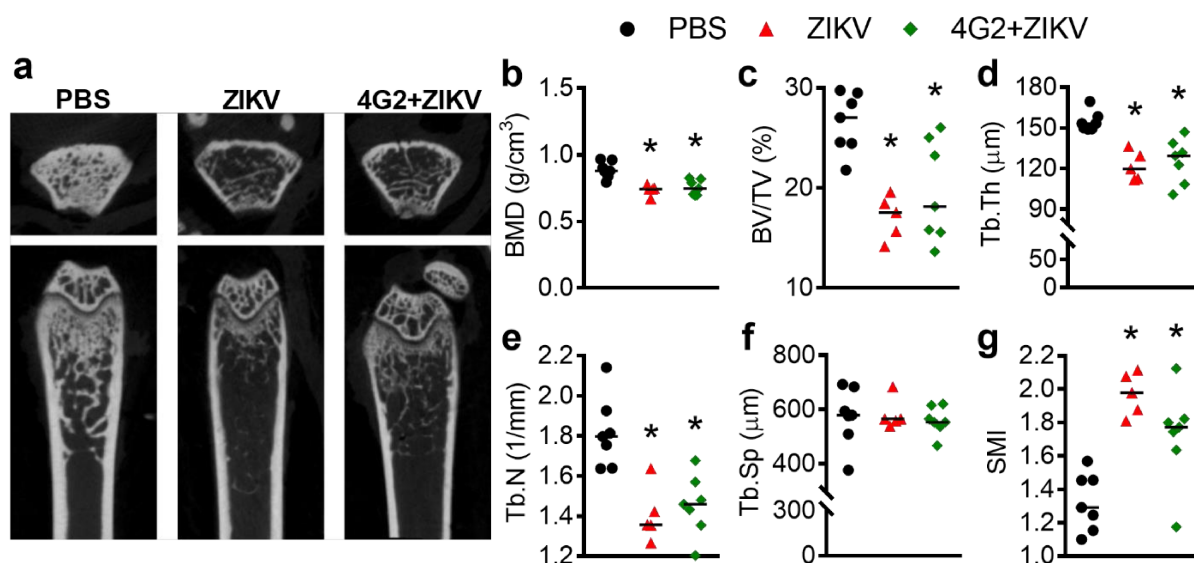


Figura 37: Análise morfométrica da estrutura de alterações na microestrutura óssea da prole associada com a infecção pelo ZIKV. Na 12^a semana de vida, os animais nascidos de mães infectadas e controles foram eutanasiados para coleta dos fêmures. As análises por imagens de microtomografia computadorizada (MicroCT; A) englobaram os seguintes parâmetros: densidade mineral óssea (B; BMD, g/cm³), fração do volume ósseo trabecular (C; BV/TV %), espessura trabecular (D; Tb.Th, µm), número de trabéculas (E; Tb.N, 1/mm), separação trabecular (F; Tb.Sp, µm) e índice de modelo estrutural (G; SMI). Os resultados foram expressos como mediana. Nos gráficos: *, p<0,05 vs. Controle PBS como avaliado por ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

O remodelamento ósseo requer a ação coordenada de osteoclastos (células de reabsorção óssea), osteoblastos (células de formação óssea) e osteócitos (células

mecanosensoriais). Neste contexto, essas células foram analisadas por técnicas histológicas. A Figura 38 mostra micrografias representativas de osteoclastos (painel superior), osteoblastos e osteócitos (painel inferior) de todos os grupos. Osteoclastos foram identificados como células multinucleadas coradas para a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP; setas vermelhas no painel superior da Figura 38D), osteoblastos foram reconhecidos nas secções pelo seu tamanho, forma e posição no osso (setas pretas no painel inferior na Figura 38D) e os osteócitos foram envoltos por osso na trabécula óssea do fêmur (quadrados vermelhos no painel inferior na Figura 38D). De acordo com a avaliação por microCT, um aumento no número de osteoclastos (Figura 38A) e de osteócitos (Figura 38B) foi encontrado nos grupos ZIKV e 4G2+ZIKV em relação aos controles PBS nas análises histológicas. Contagens similares de osteoblastos foram observadas nos grupos PBS e ZIKV, enquanto um aumento no número dessas células foi encontrado no grupo 4G2+ZIKV (Figura 38C).

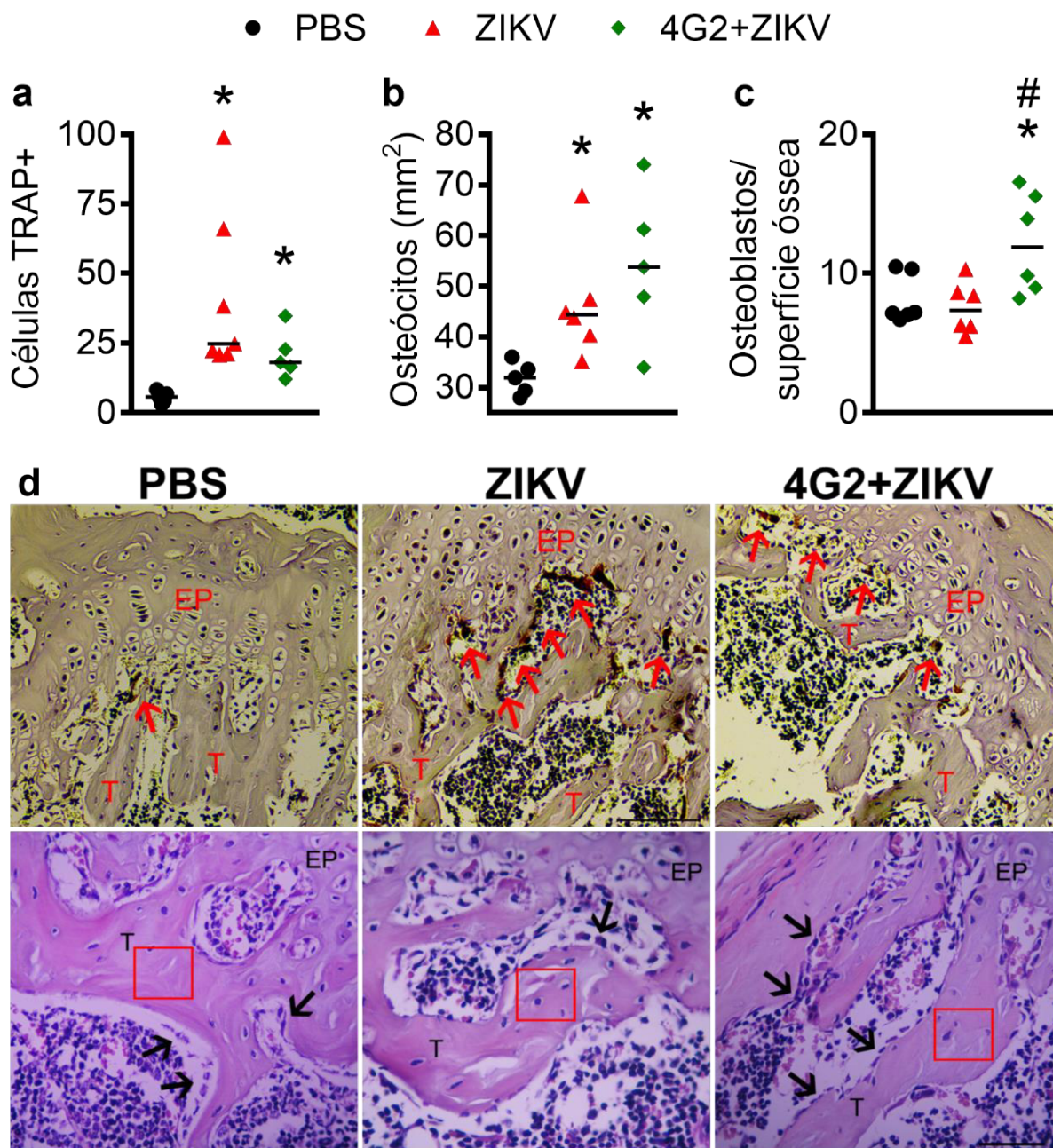


Figura 38: Alterações celulares associadas com a perda óssea da prole resultante da infecção pelo ZIKV. Análises histológicas foram empregadas com o objetivo de contar o número de células TRAP positivas (osteoclastos, A), osteócitos (B) e osteoblastos (C). Nas imagens representativas de osteoclastos (D, painel superior): setas vermelhas indicam osteoclastos TRAP positivos; T = osso trabecular, EP = disco epifisário. Magnificação: 20X. Nas imagens representativas de osteoblastos (D, painel inferior): setas pretas demonstram osteoblastos em contato com osso trabecular; quadrado vermelho indica área onde osteócitos foram contados). Magnificação: 40X. Os resultados foram expressados como mediana. Nos gráficos: *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS. #, $p < 0,05$ vs. grupo ZIKV como avaliado por ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

Para investigar os mecanismos moleculares envolvidos na perda óssea femoral após a infecção congênita pelo ZIKV, alguns fatores pró-inflamatórios cruciais para o remodelamento ósseo foram analisados por qPCR, que incluíram RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B), RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa-B), OPG (osteoprotegerina), IL-6 e TNF- α . Os resultados mostraram um aumento na razão RANKL/OPG (Figura 39A) no fêmur da prole nascida das fêmeas do grupo ZIKV. Aumento da transcrição de mRNA de IL-6 (Figura 39B) nos grupos ZIKV e 4G2+ZIKV também foi observado, sendo esta elevação semelhante entre esses grupos. Diferenças na transcrição de RANK (Figura 39C) ou TNF- α (Figura 39D) não foram observadas entre ambos os grupos infectados quando comparados ao controle PBS.

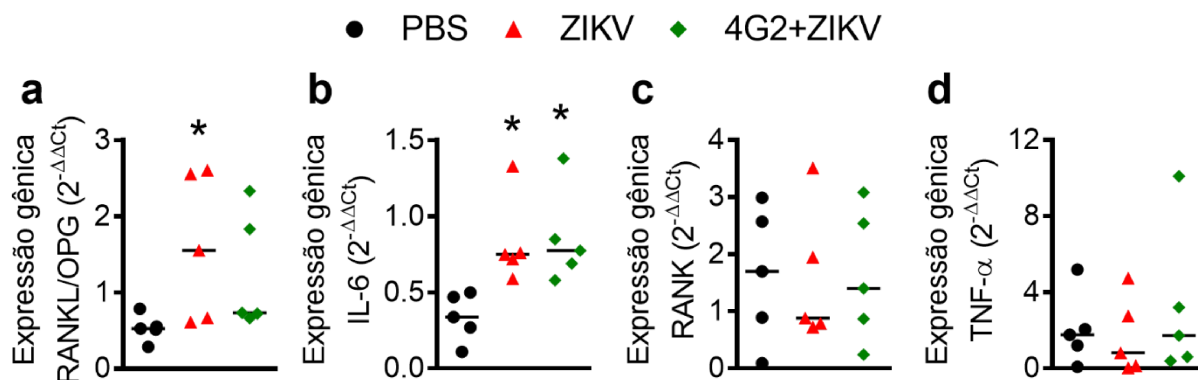


Figura 39: Alterações moleculares associadas com a perda óssea da prole resultante da infecção pelo ZIKV. A expressão gênica foi analisada por qPCR dos seguintes genes: ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) para determinação da razão RANKL/OPG (A); IL-6 (B); receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK; C) e TNF- α (D). *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS, como avaliado por ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

A fim de confirmar os dados *in vivo*, células da medula óssea (BMCs) obtidas de fêmures da prole adulta foram cultivadas *in vitro* para a diferenciação em osteoclastos e osteoblastos através da adição do fator solúvel estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e RANKL ou com um meio de diferenciação osteoblástica, respectivamente. Uma vez que diferenças *in vivo* não foram observadas entre os grupos ZIKV e 4G2+ZIKV nas análises anteriores, os experimentos *in vitro* foram conduzidos com BMCs de fêmures dos animais dos grupos PBS e ZIKV. Esses experimentos *in vitro* confirmaram os dados *in vivo*, nos quais revelaram uma redução da viabilidade de osteoclastos um aumento da diferenciação das BMCs para

osteoclastos, como determinado, respectivamente, pelo aumento no MTT e também do número de células TRAP positivas no grupo ZIKV em relação ao controle PBS (Figura 40). Ainda, um aumento na atividade osteoblástica, verificado pelo aumento na absorbância do vermelho de alizarina, também foi detectado em BMCs obtidos da prole de mães infectadas pelo ZIKV em relação à controle PBS (Figura 41).

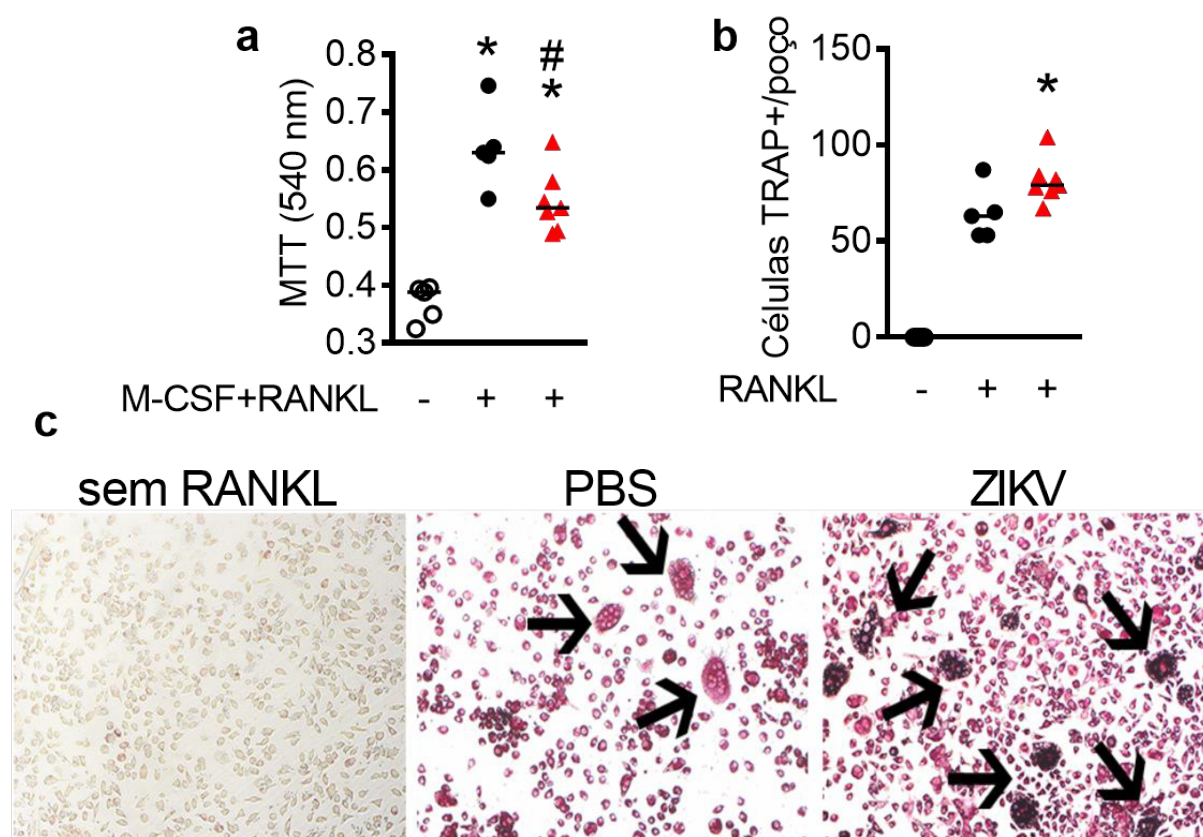


Figura 40: Avaliação da diferenciação de BMCs em osteoclastos. As células da medula óssea (BMCs) de animais nascidos de mães injetadas com ZIKV ou PBS foram cultivados na presença do fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) e RANKL para estimular a diferenciação de osteoclastos. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT (A) e o número de osteoclastos por contagem de células TRAP+ (B). Fotomicrografia representativa de osteoclastos (C; setas pretas). Magnificação: 40X. Os resultados foram expressos como mediana. Nos gráficos: *, $p < 0,05$ vs. grupos não tratados com RANKL. #, $p < 0,05$ vs. grupos PBS tratados com RANKL, como avaliado por ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

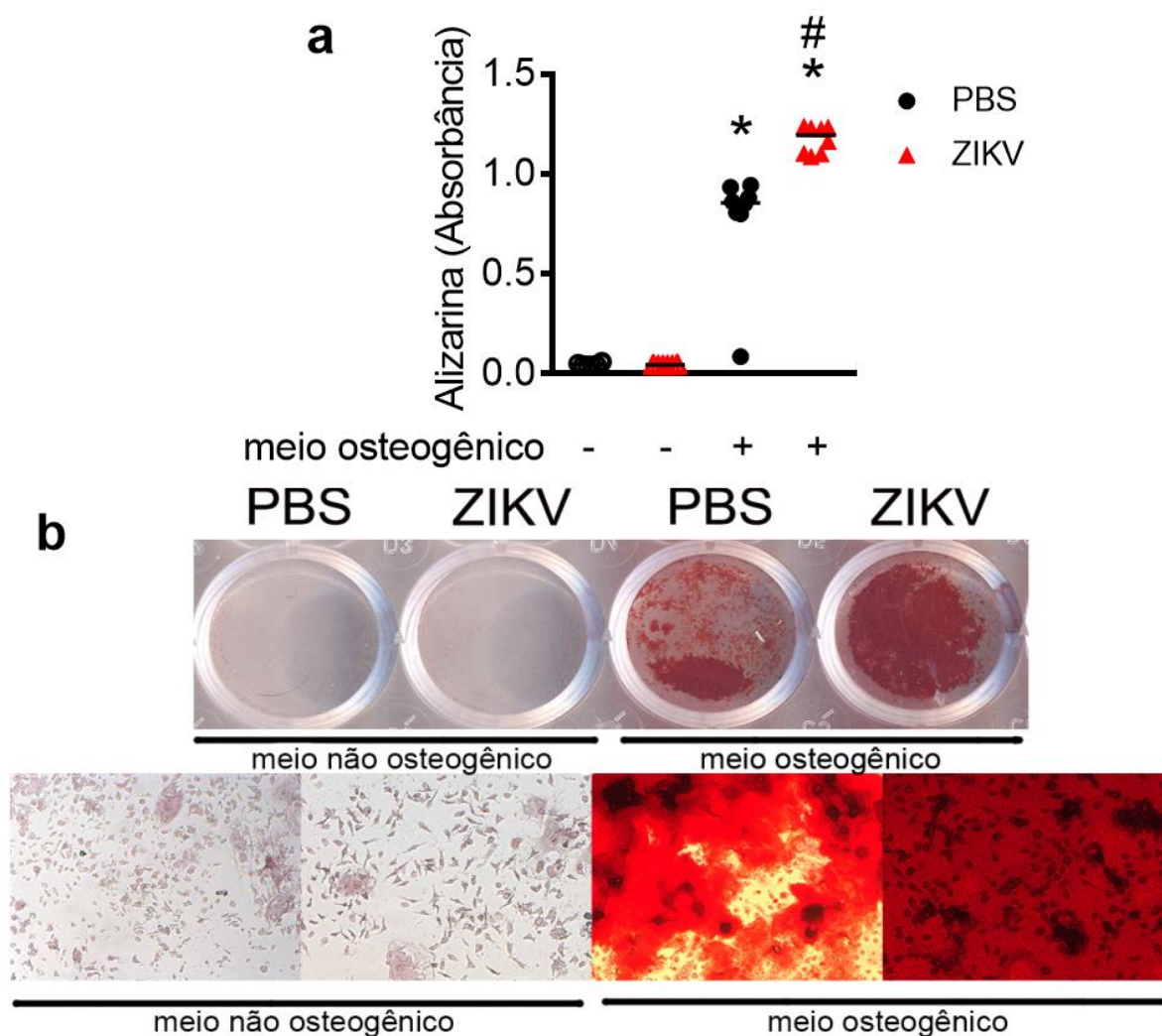


Figura 41: Avaliação da diferenciação de BMCs em osteoblastos. As BMCs dos animais ZIKV e PBS foram cultivadas na presença de dexametasona, ácido ascórbico β -glicerofosfato para induzir a diferenciação em osteoblastos em um período experimental de 21 dias. Então, as concentrações de fosfatase alcalina (ALP) no meio foram quantificadas indiretamente através da coloração do vermelho de alizarina (A). Imagens representativas do cultivo de BMCs no meio osteogênico: poços da placa de cultura no painel superior em B e sob aumento de 40X no painel inferior em B. Os resultados foram expressos como mediana. Nos gráficos: *, $p < 0,05$ vs. grupo não-osteogênico. #, $p < 0,05$ vs. grupo com meio osteogênico, como avaliado por *two-way* ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

5.8) A administração terapêutica de um peptídeo antiviral (AH-D) reduz a frequência de infecção viral e a morte fetal induzida pela infecção congênita pelo ZIKV

O ZIKV infecta o SNC e causa neuroinflamação, na qual é associada com alterações neurológicas (BROUTET et al., 2016; COSTA et al., 2017; CUGOLA et al., 2016; GARCEZ et al., 2016a). Logo, compostos com atividade antiviral podem ser essenciais para a prevenção dessas alterações. Um peptídeo cérebro-penetrante desenvolvido recentemente, denominado peptídeo AH-D (JACKMAN; SHI; CHO, 2018), foi capaz de inibir a infecção pelo ZIKV e sua dispersão sistêmica e no cérebro de camundongos adultos imunocomprometidos (JACKMAN et al., 2018). A fim de avaliar se o peptídeo AH-D poderia inibir a replicação viral e a morte fetal, o peptídeo foi administrado terapêuticamente (25 mg/kg diariamente), iniciando 3 dias após a infecção das fêmeas grávidas pelo ZIKV. Um grupo controle recebeu a solução veículo (DMSO 5% em PBS) no mesmo esquema experimental. Uma vez que os camundongos submetidos ao tratamento com 4G2 apresentaram, de modo geral, maior impacto no desenvolvimento embrionário, esse modelo (Figura 12) foi escolhido para avaliar o tratamento terapêutico com AH-D. No DE 15,5, as secções cesarianas foram realizadas para coleta das placentas e embriões para mais análises (Figura 42).

A Figura 42A mostra que enquanto 7 de 54 filhotes (13%) das fêmeas tratadas com o veículo apresentaram cópias do RNA de ZIKV recuperados do cérebro, a administração terapêutica do peptídeo AH-D preveniu a detecção do RNA de ZIKV em todos os 36 filhotes (0%). De acordo, a frequência de morte fetal reduziu de 21% no grupo veículo para 10% nas fêmeas tratadas com AH-D (Figura 42B). Entretanto, a inibição da replicação viral pela terapia com AH-D foi insuficiente para prevenir a redução do peso fetal e placentário induzida pela infecção pelo ZIKV (Figura 42C-D). Portanto, os resultados mostram que a administração terapêutica de AH-D foi capaz de prevenir a infecção congênita pelo ZIKV e reduzir a morte fetal causada pelo vírus, podendo assim, potencialmente ser utilizada como uma terapia para prevenir os sintomas da SCZ.

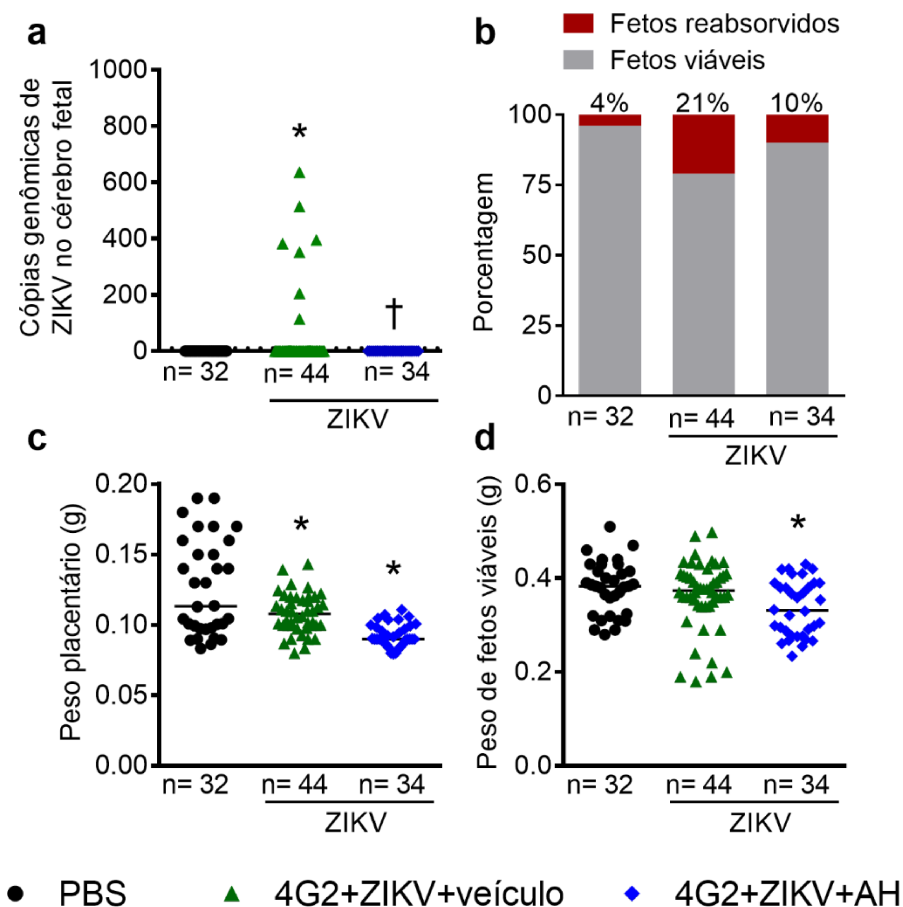


Figura 42: Viabilidade fetal e carga viral após tratamento com peptídeo AH-D. As fêmeas grávidas foram eutanasiadas no DE 15,5 para coleta dos embriões e placenta, sendo o RNA do ZIKV foi quantificado por qRT-PCR no cérebro fetal (A). As má-formações foram registradas (B) e os embriões e placentas foram e pesados (C-D). Os dados de pesos foram expressos como mediana. Os resultados de qRT-PCR foram representados como mediana do número de cópias do RNA de ZIKV por mg de amostra de RNA. *, $p < 0,05$ vs. Controle PBS. †, $p < 0,05$ vs. grupo 4G2+ZIKV como avaliado por ANOVA seguido do teste *post-hoc* Newmann-Keuls.

5.9) A infecção congênita pelo ZIKV associada ao estresse no período pós-natal não causa alterações comportamentais da prole na vida adulta

Inicialmente, uma análise do impacto da infecção pelo ZIKV sobre o neurodesenvolvimento foi realizada. Essas análises indicaram que a infecção pelo ZIKV por si só não induziu alterações comportamentais na prole dos camundongos imunocompetentes (Tabela 2). Porém essa infecção associada a um segundo insulto no período pós-natal da prole pode resultar em alterações neuropatológicas na idade adulta desses animais (GIOVANOLI et al., 2013). A fim de avaliar essa hipótese, uma segunda coorte de fêmeas grávidas foi infectada com ZIKV no DE 5,5, enquanto um

grupo de fêmeas controle recebeu PBS. Após o nascimento da prole, os filhotes machos foram subdivididos em dois grupos, sendo metade dos animais submetida a um protocolo de estresse imprevisível (grupo estresse positivo, S+) entre os dias pós-natal (DPN) 30 e 40, enquanto os animais restantes da prole não foram perturbados (grupo estresse negativo, S-). Na idade adulta, o comportamento desses animais foi avaliado entre as semanas 8 e 12 de vida. Por fim, o volume cerebral foi avaliado por MRI. Os resultados dessas análises estão apresentados na Figura 43.

Os animais que foram submetidos aos dois estressores ambientais (grupo ZIKV S+) apresentaram redução no volume cerebral em comparação com os grupos PBS submetidos ao protocolo de estresse (S+) ou não (S-) (Figura 43A). Não foi observada diferença no volume cerebral entre os animais do grupo ZIKV não estressado (ZIKV S-) em relação aos controles PBS (S+ e S-). Os animais não apresentaram alterações na interação social, representado pelos índices de sociabilidade (Figura 43B) e de memória social (Figura 43C). Os resultados do teste do campo aberto mostraram ausência de alteração locomotora (Figura 43D) e de comportamento relacionado a ansiedade, avaliado pelo número de entradas (Figura 43E) e tempo (Figura 43F) no centro da arena. Além da memória social, a memória de trabalho dos animais também estava preservada, como analisado pela alternância entre os braços do labirinto em Y (Figura 43G). Os animais não apresentavam comportamento compulsivo, como avaliado pelo teste de enterramento de esferas (Figura 43H), ou anedônico, avaliado pelo teste de preferência a sacarose (Figura 43I). Por fim, similar ao observado no teste do campo aberto, o comportamento de ansiedade também foi similar entre os grupos no teste do labirinto em cruz elevado, como avaliado pelo tempo (Figura 43J) e número de entradas (Figura 43K) nos abertos/fechados do aparato experimental. Assim, a infecção congênita pelo ZIKV associada a um segundo insulto no período pós-natal causa uma redução no volume cerebral, mas isso não reflete em alterações comportamentais na prole adulta nesse modelo experimental utilizado.

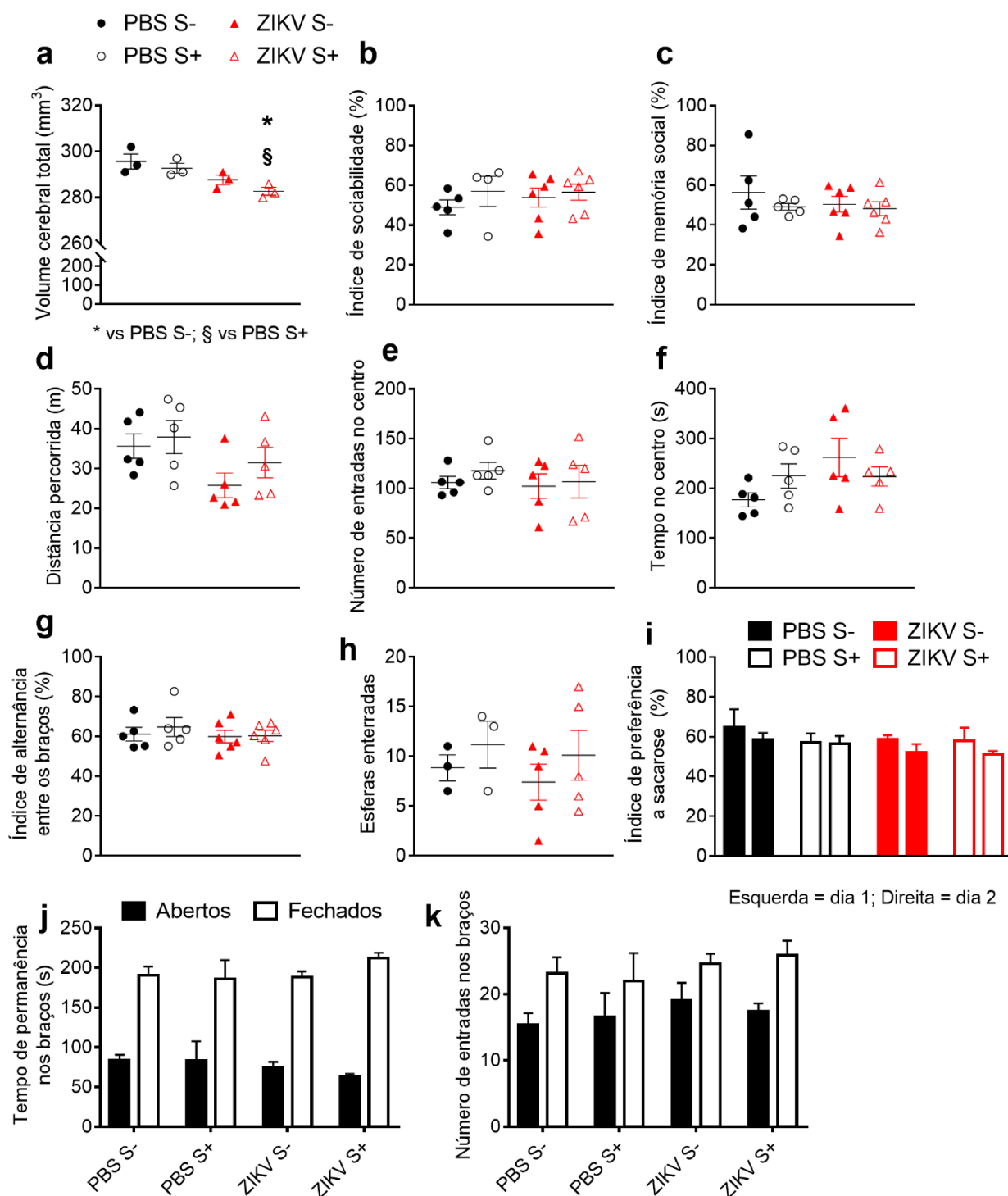


Figura 43: Avaliação de alterações neuropatológicas da prole adulta resultantes de dois insultos ambientais. Os animais machos da prole nascidas de uma segunda coorte de mães controle ou infectadas pelo ZIKV, considerado o primeiro insulto ambiental, foram subdivididos em dois grupos: um grupo controle que não foi perturbado (S-) e outro que foi submetido a um protocolo de estresse imprevisível subcrônico (S+), considerado o segundo insulto ambiental. O volume cerebral foi quantificado por MRI na 12^a semana de vida (A). Diversos testes comportamentais foram realizados para avaliar se o estresse poderia revelar alterações neuropatológicas latentes devido à infecção pelo ZIKV: sociabilidade (B) e memória social (C) para avaliar a interação social; o campo aberto (D-F), que avaliou a locomoção basal (D) e

também o comportamento relacionado a ansiedade (E-F); labirinto em Y (G) para avaliar a memória de trabalho; enterramento de esferas (H) como avaliação do comportamento compulsivo dos animais; teste de preferência a sacarose (I) para avaliar o comportamento anedônico, relacionado a depressão; e o labirinto em cruz elevado (J-K) para avaliar também o comportamento tipo ansiedade. Os dados foram representados como média \pm SEM. Os dados foram analisados por *one-way* ANOVA seguido de Newmann-Keuls como pós-teste.

6. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo são: *i*) a infecção pelo ZIKV em camundongos fêmeas grávidas imunocompetentes causa uma inflamação sistêmica transiente (AIM), infecção placentária e morte fetal; *ii*) a administração de anticorpos pan-flavivirus em concentrações subneutralizantes previamente à infecção congênita pelo ZIKV parece aumentar a infecção congênita pelo ZIKV, como observado pela AIM prolongada, maior infecção do cérebro dos embriões, morte fetal, além de causar uma hiporresponsividade à produção de alguns mediadores inflamatórios na placenta; *iii*) a infecção congênita pelo ZIKV também induziu importantes alterações no cérebro, olhos, testículos e ossos da prole adulta; *iv*) as alterações no neurodesenvolvimento causadas pelo ZIKV não resultou em alterações comportamentais detectáveis nesse modelo experimental, mesmo com a administração de anticorpos pan-flavivirus ou a exposição da prole a um segundo insulto ambiental no período pós-natal; *v*) com exceção de algumas alterações nos compartimentos intratubulares testiculares, alterações nos testículos e ossos da prole de camundongos infectados não foram, em geral, exacerbadas pela administração prévia de anticorpos pan-flavivirus, enquanto danos no cérebro e olhos foram acentuados por estes anticorpos. Finalmente, *vi*) o tratamento com um peptídeo antiviral conhecido por diminuir a replicação do ZIKV *in vivo* reduziu a frequência de infecção no cérebro e a morte fetal nesse modelo de infecção congênita pelo ZIKV.

Evidências epidemiológicas implicam a ativação do sistema imune materno durante a gravidez por diversos estímulos, incluindo agentes infecciosos como os patógenos TORCH, ao desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas na idade adulta, como a depressão, ansiedade (ENAYATI et al., 2012), autismo (CHOI et al., 2016), esquizofrenia (LI et al., 2009) e outros (ESTES; MCALLISTER, 2016; KNUESSEL et al., 2014; PATTERSON, 2009) A administração do ácido polinosínico:policitidílico (poly I:C), no qual é um agonista do receptor do tipo Toll (TLR) 3, em camundongos fêmeas grávidas induz uma resposta imune aguda

algumas horas após a injeção, na qual é caracterizada pelo aumento de concentrações de diversos mediadores inflamatórios no soro materno (ARRODE-BRUSÉS; BRUSÉS, 2012) e também da ocorrência de anormalidades comportamentais e neuroanatômicas na prole adulta (DA SILVEIRA et al., 2017). Aqui, a infecção congênita pelo ZIKV resultou em AIM, como demonstrado por elevados níveis das citocinas pró-inflamatórias CCL2, CXCL-10 no baço e IL-6 no plasma de fêmeas grávidas após 2 h da infecção pelo ZIKV, além de IL-17 com 24 hpi. Interessantemente, na presença de doses subneutralizantes de anticorpos anti-E pan-flavivírus (4G2) há um prolongamento da detecção de CCL2 até 24 h de infecção pelo ZIKV, sugerindo que o fenômeno de ADE poderia contribuir para a exacerbação da AIM durante a infecção congênita pelo ZIKV. De acordo, a produção de IL-17 mediada por IL-6 desempenha um papel chave na AIM, como demonstrado em estudos prévios (GRAHAM et al., 2018; MEYER, 2014; RUDOLPH et al., 2018). Níveis elevados de IL-6 no soro materno de humanos e camundongos têm sido associados com efeitos nocivos na prole (MEYER, 2014). Em humanos, altos níveis maternos de IL-6 foram associados com alterações estruturais de cérebros de recém-nascidos e fenótipos comportamentais relevantes para induzir AIM e resultar em distúrbios psiquiátricos em crianças de 2 anos de idade (GRAHAM et al., 2018; RUDOLPH et al., 2018). Corroborando esses dados, Smith e colaboradores mostraram experimentalmente que uma única injeção de IL-6 em camundongos fêmeas grávidas foi suficiente para induzir alterações comportamentais na prole associadas com esquizofrenia e autismo, nas quais foram prevenidas bloqueando IL-6 *in vivo* (SMITH et al., 2007).

A placenta é um órgão complexo que exerce diversas funções além de trocas gasosas e fornecimento de nutrientes, como também a remoção de resíduos e barreira imune para proteção do feto (WANG, 2017). Estudos anteriores já mostraram que o ZIKV possui tropismo para diversos tipos celulares da placenta, no qual é associado com dano tecidual e consequências deletérias para o feto em crescimento (MINER et al., 2016b; QUICKE et al., 2016; SZABA et al., 2018; TABATA et al., 2018; VERMILLION et al., 2017; YOCKEY et al., 2016). Semelhante ao trabalho realizado por Rathore e colaboradores (2019), no presente trabalho, não foi detectado um aumento de cópias de RNA do ZIKV nas placentas derivadas de mães do grupo 4G2+ZIKV em comparação com as fêmeas infectadas com ZIKV e tratadas com anticorpo controle de isotipo, mas uma elevada carga genômica no cérebro fetal do grupo 4G2+ZIKV foi observada. De fato, as análises de mediadores inflamatórios

nessas placentas mostraram um perfil geral de hiporresponsividade placentária caracterizada por níveis reduzidos de CCL2, IFN- γ , IL-10, TGF- β e TNF no grupo 4G2+ZIKV. Em contraste, níveis elevados de IL-6 foram encontrados no cérebro da prole nascida dessas mães e foram associados com uma maior frequência de má-formações da prole. Interessantemente, não foram encontradas alterações nos níveis de mediadores inflamatórios no grupo infectado com ZIKV na ausência de anticorpos pan-flavivirus, fornecendo evidência do papel do fenômeno de ADE no aumento da infecção pelo ZIKV e sugerindo que existe uma indução de neuroinflamação na prole. Em acordo, diversos estudos *in vitro* e modelos experimentais em camundongos suportam a ocorrência do fenômeno de ADE durante a infecção pelo ZIKV (BARDINA et al., 2017; BROWN et al., 2019; CASTANHA et al., 2017; DEJNIRATTISAI et al., 2016; HERMANNNS et al., 2018; HUESTON; RAMIREZ; MAHALINGAM, 2017; LI et al., 2018; PAUL et al., 2016; RATHORE et al., 2019; ROGERS et al., 2017; WANG et al., 2020; ZIMMERMAN et al., 2018). Interessantemente, no contexto de infecção pelo DENV, diversos estudos tem demonstrado que além de elevadas cargas virais, o fenômeno de ADE também contribui com uma resposta inflamatória alterada, caracterizada pela supressão de respostas antivirais (CHAREONSIRISUTHIGUL; KALAYANAROOJ; UBOL, 2007; UBOL et al., 2010). Enquanto níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 está normalmente aumentada, IL-12, IFN- γ , ISGs, IFN tipo I e TNF estão suprimidos. Mecanicamente, IL-10 inibe a ativação de STAT-1 e IRF-1 e, conseqüentemente, as respostas de IFN tipo I e a produção de óxido nítrico, as quais são importantes moléculas intracelulares antivirais contra DENV e outros flavivírus (CHAREONSIRISUTHIGUL; KALAYANAROOJ; UBOL, 2007; FAGUNDES et al., 2011; STEINBACH, 2018). Corroborando esses achados Hueston e colaboradores (2017) mostraram que o ADE de ZIKV por anticorpos específicos contra DENV em macrófagos humanos primários foi associado com baixos níveis de fatores antivirais, como IFN- β e intermediários reativos de nitrogênio. Entretanto, outros autores reportaram uma falta de reatividade cruzada ou até proteção da infecção pelo ZIKV após infecção por DENV em modelos experimentais e clinico-epidemiológicos (BREITBACH et al., 2019; HALAI et al., 2017; MCCRACKEN et al., 2017; PANTOJA et al., 2017; RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2019; TERZIAN et al., 2017; WEN et al., 2017). Em um estudo com mulheres grávidas, Halai e colaboradores (2017) não encontraram associação entre a presença prévia de anticorpos contra DENV com maior gravidade da doença, carga genômica viral ou anormalidades fetais. Resultados

similares foram encontrados em outro trabalho com uma população geral, não limitada apenas a mulheres grávidas (TERZIAN et al., 2017). Em outro estudo em humanos, a imunidade prévia contra DENV foi associada com a redução do risco de infecção por ZIKV (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2019). Trabalhos com primatas não humanos não encontraram aumento ou proteção de infecção secundária por ZIKV realizada um ano (BREITBACH et al., 2019), ou período maior (MCCRACKEN et al., 2017; PANTOJA et al., 2017), após uma infecção primária por DENV. Além disso, a infecção primária por DENV reduziu a carga viral de uma infecção secundária por ZIKV realizada após 28 dias em camundongos imunodeficientes, sendo essa proteção foi mediada por células T CD8⁺, pois a transferência passiva do soro anti-DENV não promoveu neutralização ou proteção de uma infecção secundária em camundongos *naïve* (WEN et al., 2017). No contexto de AIM, Gilmore e colaboradores (2004) demonstraram que concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias impactam negativamente no desenvolvimento de dendritos de neurônios corticais, causando uma neuropatia similar à esquizofrenia (GILMORE et al., 2004). De fato, níveis elevados de IL-6 no soro de mães e no cérebro da prole de modelos murinos (ARSENAULT et al., 2014; GOLAN et al., 2005; MEYER et al., 2006) e primatas não-humanos, são associados com essas condições de neurodesenvolvimento (ROSE et al., 2017). Finalmente, Hsiao (2011) confirmou níveis de IL-6 na placenta como um mediador crucial envolvido nesses processos. Em conjunto, os resultados desse trabalho corroboram a ideia de que o fenômeno de ADE poder contribuir para o aumento da infecção pelo ZIKV e AIM, nos quais podem eventualmente contribuir com as graves consequências associadas à SCZ.

O Brasil enfrentou uma epidemia recente de microcefalia e más-formações congênitas, com um alto nível de causalidade associado com infecções pelo ZIKV (HEYMANN et al., 2016). Enquanto os impactos a curto prazo da infecção congênita pelo ZIKV têm sido investigados em detalhes (BRASIL et al., 2016; CUGOLA et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2018; DUDLEY et al., 2018; HIRSCH et al., 2018; MINER et al., 2016b), apenas alguns trabalhos começaram a investigar as consequências a longo prazo da SCZ na prole. Neste contexto, Satterfield-Nash e colaboradores (2017) acompanharam a saúde e desenvolvimento de 19 crianças com diagnóstico confirmado de microcefalia no nascimento até 19-24 meses de idade. Os resultados revelaram que a maioria destas crianças apresentaram dano motor grave, quadros de epilepsia, anormalidades visuais e auditivas e também dificuldades do sono. Os

autores concluíram que essas crianças que possuem limitações funcionais graves requereriam cuidado especializado de clínicos e cuidadores à medida que elas envelhecerem (SATTERFIELD-NASH et al., 2017). Aqui, usando MRI, foi demonstrado que a infecção congênita pelo ZIKV foi associada com a redução no volume cerebral da prole adulta dos grupos infectados, ZIKV e 4G2+ZIKV, sugerindo uma alteração do desenvolvimento cerebral na idade adulta. Especificamente, o fenômeno de ADE por si só não foi associado com um pior fenótipo em comparação com as mães infectadas apenas com o ZIKV, nas quais receberam anticorpos controle de isotipo. De acordo, análises de MRI conduzidas em crianças nascidas de mães infectadas pelo ZIKV com diagnóstico confirmado de microcefalia durante a epidemia no Brasil revelou uma redução do parênquima cerebral (OLIVEIRA et al., 2016), bem como outras alterações, como má-formações corticais, ventriculomegalia, septação de ventrículos laterais, anormalidades calosas e hipoplasia cerebelar (ZARE MEHRJARDI et al., 2017). Junto às alterações macroscópicas observadas, análise histopatológica do cérebro da prole revelou um aumento na neurodegeneração nos animais de ambos os grupos infectados ZIKV, além de uma menor contagem de neurônios no grupo 4G2+ZIKV. Esses achados estão de acordo com diversas análises experimentais conduzidas em camundongos recém-nascidos, nos quais uma desorganização cortical após a infecção pelo ZIKV também é observada (CUGOLA et al., 2016; LI et al., 2016; SHI et al., 2018; WU et al., 2016).

Algumas consequências a longo prazo da infecção no início do período pós-natal já foram reportadas experimentalmente por Souza e colaboradores (2018). Usando camundongos suíços inoculados com o ZIKV por via subcutânea três dias após o nascimento natural, os autores mostraram a ocorrência de microcefalia pós-natal e alterações comportamentais durante a vida adulta, como mostrado pelo aumento de episódios de convulsões, disfunções motoras e cognitivas na prole adulta (NEM DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2018). Os resultados deste trabalho, usando um modelo em camundongos imunocompetentes, que melhor reflete as alterações observadas em humanos que camundongos imunodeficientes, seguido da inoculação com ZIKV durante o período gestacional, corroboraram a maioria desses achados, sugerindo que a infecção pelo ZIKV induz diversas anormalidades de neurodesenvolvimento na prole até a vida adulta. Entretanto, a infecção materna no DE 5,5 por via intraperitoneal não foi capaz de induzir abnormalidades comportamentais significantes na idade adulta, mesmo na presença de anticorpos

pan-flavivirus. Um estudo publicado anteriormente por Julander e colaboradores (2018) mostrou que a infecção maternal no DE 7,5 por via intraperitoneal pelo ZIKV em camundongos AG129, os quais não possuem os receptores de IFN tipo I e II, resultou na perda auditiva transiente e uma restrição de crescimento da prole, mas não foi observado qualquer déficit motor ou cognitivo na idade adulta (JULANDER et al., 2018). Esses resultados sugerem um importante conceito de “janela de oportunidade”, quando há uma maior probabilidade de a infecção induzir as alterações de longo prazo nesse estágio, como alterações neurológicas, e sugerem que a placenta pode desempenhar um papel mais importante devido a maior troca de substâncias entre a mãe e o feto em crescimento.

Alguns insultos ambientais, como infecções maternas durante a gestação, podem constituir um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas em indivíduos com uma predisposição genética (CLARKE et al., 2009). Mas não são apenas alterações que ocorrem nesse período que podem ter impactos negativos para a prole. O período de desenvolvimento pré-púbere, que é compreendido entre os DPN 30-40 em camundongos e aproximadamente de 8 a 14 anos em humanos, é conhecido por ser altamente sensível a estressores ambientais que culminam no desenvolvimento de alterações comportamentais, neuroanatômicas e endócrinas na idade adulta da prole. Dessa forma, uma infecção durante a gestação pode constituir um insulto pré-natal que torna a prole mais susceptível aos efeitos patológicos de um segundo insulto no período pós-natal, como estresse, culminando no desenvolvimento de alterações neuropatológicas na idade adulta (GIOVANOLI et al., 2013). Essas possibilidades são englobadas de forma geral pela hipótese conhecida como dois insultos, ou hipótese *two-hit* (CALCIA et al., 2016; FEIGENSON; KUSNECOV; SILVERSTEIN, 2014). Como alterações comportamentais não foram observadas inicialmente na prole nascida de animais infectadas pelo ZIKV, foi testada a hipótese de que o estresse pós-natal no período pré-púbere poderia revelar uma alteração neuropatológica latente devido à infecção pelo ZIKV. Os animais submetidos aos dois estímulos (ZIKV S+) apresentaram menor volume cerebral que todos os outros grupos, não infectados (PBS S- e PBS S+) e infectado sem exposição ao estresse pós-natal (ZIKV S-), porém não foram observadas alterações comportamentais nos testes utilizados nesse estudo. Giovaneli e colaboradores (2013, 2016) mostraram que apenas animais adultos que nasceram de mães injetadas com Poly I:C e foram expostos ao estresse no período pré-pubere apresentaram

alterações neuroquímicas e anormalidades comportamentais, como redução da inibição de pré-pulso do reflexo de sobressalto acústico e precipitação do comportamento de hipersensibilidade à drogas psicomiméticas. Essas observações são consistentes com curso clínico de doenças neuropsiquiátricas com início tardio, como a esquizofrenia e transtorno bipolar (GIOVANOLI et al., 2013; PAUS; KESHAVAN; GIEDD, 2008). Deslauriers e colaboradores (2016) utilizaram outro tipo de modelo *two-hit* de esquizofrenia com características suicidas, sendo induzida a ativação imune materna com poly I:C no DE 12 como primeiro insulto e um isolamento social por quatro semanas após o desmame no DPN 21 como segundo insulto. Os animais apresentaram alterações comportamentais como déficit da inibição de pré-pulso e sociabilidade, sendo os efeitos de ambos os insultos sinérgicos (DESLAURIERS et al., 2016). Ben-Yehuda e colaboradores (2019) usaram outro modelo *two-hit* de doenças neuropsiquiátricas, onde o primeiro insulto foi induzido com injeção de INF- β no DE 14,5 e um protocolo de separação materna diária entre os DPN 1 e 14 como segundo insulto. Os autores observaram que a distância percorrida no teste do labirinto em cruz elevado, parâmetro não avaliado no presente trabalho, foi maior em animais fêmeas de 3 meses de idade do grupo submetido aos dois estímulos em comparação com o grupo controle do primeiro *hit* (injetado com solução veículo e submetido ao estresse pós-natal). Segundo os autores, esses mesmos animais apresentaram uma tendência de maior enterramento de esferas e de mais tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, embora os resultados não foram estatisticamente significativos (BEN-YEHUDA et al., 2019). Dessa forma, a comparação dos resultados obtidos nesse trabalho com a literatura é difícil devido às várias diferenças metodológicas, tanto no protocolo dos dois insultos ambientais como na avaliação comportamental. Assim, não se pode excluir a possibilidade de que alterações comportamentais sejam observadas caso outros testes comportamentais e/ou outro protocolo de estresse seja empregado.

A infecção pelo ZIKV tem sido associada com diversas anormalidades oftalmológicas. Por exemplo, de Paula Freitas e colaboradores (2016) investigou a ocorrência de danos oculares em 29 crianças com diagnóstico de microcefalia confirmado que nasceram durante a epidemia de ZIKV no estado da Bahia, Brasil. Os resultados revelaram que desses pacientes, 10 deles (34,5%) apresentaram anormalidades oftalmológicas como pigmentação mosqueada focal, atrofia coriorretinal com uma predileção para a área macular. De acordo com esses dados,

outras alterações como catarata, coloboma, atrofia coriorretinal, pigmentação mosqueada macular, maculopatia, atrofia e hipoplasia do nervo óptico, anormalidades vasculares da retina, dano no nervo óptico, microftalmia, descontinuação do epitélio pigmentar da retina, aumento da PIO e glaucoma congênito (AGRAWAL et al., 2017; DE PAULA FREITAS et al., 2017a, 2017b; MIRANDA et al., 2016; VENTURA et al., 2016a; WONG et al., 2017; YEPEZ et al., 2017; ZIN et al., 2017) também foram reportados, mesmo em crianças com perímetro cefálico normal. Entretanto, uveíte não foi encontrada nesses casos congênitos (MARQUEZAN et al., 2017). Com isso, foi avaliado se o ADE associado com a AIM poderiam contribuir para a exacerbação das anormalidades oftalmológicas induzidas pela infecção congênita pelo ZIKV. Os resultados mostraram níveis de PIO elevados entre 4^a e 12^a semanas do grupo 4G2+ZIKV, no qual foi associado com uma grande redução nos números de CGR. Adicionalmente, a coloração de caspase-3 clivada confirmou a morte de CGRs por apoptose. Corroborando esses resultados, Shi e colaboradores (2018) e colaboradores mostraram que a inoculação intrauterina direta em camundongos C57BL/6 fêmeas grávidas imunocompetentes induziu diversas alterações oftalmológicas, caracterizado por microftalmia, atrofia da retina e nervo óptico, depleção de CGR e danos na projeção visual na prole jovem. De fato, um estudo conduzido em macacas Rhesus grávidas e infectadas pelo ZIKV também identificou anormalidades oculares (coloboma) no feto (MOHR et al., 2018). Baran e colaboradores (2019) avaliou uma coorte de crianças expostas ao ZIKV durante a gestação. Embora cerca de 20% das crianças com infecção confirmada apresentaram microcefalia e perda de acuidade visual, algumas crianças que não desenvolveram microcefalia, apresentaram um atraso no desenvolvimento visual de acordo com sua idade. Dessa forma, a infecção pelo ZIKV pode comprometer o desenvolvimento visual de crianças infectadas mesmo na ausência de microcefalia e imediata perda visual. Portanto, esses resultados indicam que a infecção congênita pelo ZIKV é associada com danos oftalmológicos a longo prazo que podem progredir para condições crônicas, levando a um impacto irreversível de perda do campo visual. Esses achados destacam danos oculares durante a SCZ como uma característica comum da infecção pelo ZIKV, que pode não necessariamente ser associada com microcefalia e sugere que crianças com uma suspeita de infecção congênita pelo ZIKV deveriam passar por uma avaliação oftalmológica mais refinada após o nascimento.

Atualmente, já está bem estabelecido que o ZIKV pode ser transmitido sexualmente (BRADLEY; NAGAMINE, 2017; JOGUET et al., 2017; MORRISON; DIAMOND, 2017; NICASTRI et al., 2016; SHAN et al., 2017; SPENCER et al., 2017). Em acordo, Duggal e colaboradores (2018) mostraram experimentalmente que a transmissão sexual pelo ZIKV contribui com uma maior disseminação do vírus no trato reprodutivo feminino, na qual impacta no desenvolvimento fetal. Entretanto, pouco é conhecido sobre os efeitos a longo prazo da infecção congênita pelo ZIKV no trato reprodutivo da prole nascida de progenitores infectados pelo vírus. No presente trabalho, importantes alterações morfológicas foram identificadas no compartimento tubular dos testículos da prole nascida de mães infectadas pelo ZIKV. Estudos recentes têm demonstrado que o ZIKV possui tropismo para diversos tipos celulares, como espermatogônia, espermatócitos primários, células de Sertoli, de Leydig, entre outras (ROBINSON et al., 2018; SPENCER et al., 2017; STASSEN et al., 2018; STRANGE et al., 2018). Uma apoptose marcante de células germinativas e desprendimento de células de Sertoli da membrana basal também leva a danos na arquitetura dos túbulos seminíferos, resultando na perda do lúmen central e na atrofia testicular (GOVERO et al., 2016; SHAN et al., 2017). Nesse sentido, os resultados desse estudo mostraram uma redução no tamanho de túbulos seminíferos, bem como degeneração do epitélio seminífero ou ausência de alguns tipos de células germinativas, particularmente espermatócitos primários, em ambos os grupos infectados pelo ZIKV (ZIKV e 4G2+ZIKV) em comparação com os controles. De nota, na presença subneutralizante dos anticorpos pan-flavivirus, alguns desses parâmetros foram exacerbados. Ainda, diversos estudos têm considerado que as células de Sertoli são um alvo chave para a infecção do ZIKV nos testículos (GOVERO et al., 2016; KUMAR et al., 2018; STASSEN et al., 2018). Os dados sugerem que o ZIKV mantém o tropismo para essas células somáticas, uma vez que a redução da eficiência das células de Sertoli foi observada no modelo experimental usado nesse trabalho. Outra consequência possivelmente associada com as alterações das células de Sertoli causadas pelo ZIKV foi a redução do índice meiótico, no qual indica que células de Sertoli não contribuíram totalmente com o desenvolvimento de células germinativas. Por outro lado, níveis reduzidos de testosterona associados com a diminuição da população de células de Leydig 3 β -HSD+ têm sido reportados na infecção aguda pelo ZIKV (GOVERO et al., 2016; STASSEN et al., 2018). No presente trabalho, alterações morfométricas significantes não foram encontradas nas células

de Leydig, sugerindo que essas células esteriodogênicas não funcionam como alvo primário para o ZIKV nos testículos infectados verticalmente. Estudos extras são necessários para investigar outros aspectos relacionados ao compartimento intertubular e a barreira testicular-sanguínea, uma vez que os danos testiculares induzidos pelo ZIKV foram também associados com infiltração de células inflamatórias e a quebra do privilégio imune dos testículos (CLANCY et al., 2018; GOVERO et al., 2016; STASSEN et al., 2018). De forma geral, os dados apresentados fornecem conhecimentos adicionais sobre as consequências a longo prazo no trato reprodutivo masculino durante a vida adulta após a transmissão vertical do ZIKV.

Além de microcefalia, a SCZ também é caracterizada por danos oftalmológicos, auditivos e alterações na formação óssea e articular (DE PAULA FREITAS et al., 2017b; FITZGERALD; BOYLE; HONEIN, 2018; HONEIN et al., 2017; VENTURA et al., 2016b; ZIN et al., 2017). A artrogripose é uma característica comum da infecção congênita pelo ZIKV (ALVINO; MELLO; OLIVEIRA, 2016; XAVIER-NETO et al., 2017). Entretanto, os efeitos da infecção congênita pelo ZIKV nas células remodeladoras dos ossos permanecem pouco conhecidos. No presente estudo, foi demonstrado que a infecção pelo ZIKV aumentou a geração de osteoclastos e osteoblastos, sugerindo um aumento no perfil de remodelamento ósseo. Consistentemente, o comprometimento da microarquitetura do fêmur da prole adulta nascida de mães infectadas pelo ZIKV, independente de imunidade prévia contra flavivírus, foi observada. Os resultados também revelaram um aumento nos números de osteoclastos e osteócitos, sem alteração nos osteoblastos, na prole dos grupos infectados por ZIKV. Esse resultado sugere uma alteração na diferenciação de osteoblastos induzida pelo ZIKV, na qual resulta no aumento da perda óssea. Como um mecanismo subjacente, uma elevada transcrição de IL-6 e da razão de RANKL/OPG foi encontrada no fêmur de camundongos nascidos de mães infectadas pelo ZIKV. O nível elevado desses mediadores está diretamente associado com a reabsorção óssea (SHIM; STAVRE; GRAVALLESE, 2018). De acordo, um estudo conduzido por Bayless e colaboradores (2016) demonstrou que o ZIKV infecta células da crista neural craniana, as quais são as progenitoras diretas de células ósseas e podem contribuir com a microcefalia associada à infecção pelo ZIKV. Ainda, a infecção de osteoclastos por DENV foi associada com o aumento da atividade osteolítica e a reabsorção óssea (HUANG et al., 2016). Finalmente, níveis elevados de IL-6, IL1- β , TNF- α e da razão RANKL/OPG foram observados durante a infecção de pacientes

por alfavírus e foram associados com o aumento da perda óssea (CHEN et al., 2014a, 2014b, 2015). De acordo com esses estudos, uma sobre-regulação da razão RANKL/OPG e da expressão de IL-6 foi observada na prole de camundongos dos grupos ZIKV e 4G2+ZIKV, nas quais podem contribuir para o dano ósseo.

Diversos estudos mostraram a associação direta da replicação do ZIKV em neurônios com dano cerebral e graves manifestações (COSTA et al., 2017; GARCEZ et al., 2016b). Porém, ainda não existem terapias antivirais aprovadas para o uso durante a infecção pelo ZIKV. Assim, torna-se urgente a busca por novas moléculas que poderiam reduzir a viremia durante os estágios iniciais da infecção ou que bloqueariam a replicação e disseminação viral. Um peptídeo cérebro-penetrante (AH-D) que possui atividade antiviral contra o ZIKV e outros arbovírus foi desenvolvido recentemente (JACKMAN; SHI; CHO, 2018). Essa atividade foi demonstrada em um modelo de infecção pelo ZIKV em camundongos A129 (imunocomprometidos) adultos (JACKMAN et al., 2018). Nesse trabalho, a eficácia terapêutica desse peptídeo foi avaliada durante a infecção congênita pelo ZIKV num modelo de infecção de camundongos imunocompetentes. Quando comparada com estratégias protetoras (SAPPARAPU et al., 2016; YU et al., 2017) objetivadas no tratamento após a exposição ao vírus (entre 1 e 24 hpi), a terapia com o peptídeo AH-D foi efetiva quando iniciada em estágios tardios (3 dpi). Os resultados mostraram que o peptídeo AH-D preveniu a detecção do RNA do ZIKV no cérebro da prole, bem como reduziu o número de embriões malformados. Dessa forma, a terapia peptídica com o AH-D demonstra o potencial para passar por dois desafios importantes associados com a infecção pelo ZIKV: *i*) transporte pela barreira hematoencefálica levando a supressão da replicação viral em cérebros infectados pelo ZIKV e *ii*) a inibição terapêutica dos efeitos da SCZ na prole de camundongos fêmeas grávidas infectadas pelo ZIKV. Embora o tratamento com AH-D preveniu a infecção pelo ZIKV no cérebro fetal e reduziu a mortalidade fetal, ele não foi capaz de prevenir completamente os danos fetais causados pelo ZIKV, sugerindo que respostas do hospedeiro ativadas pela infecção também são importantes para a patogênese do ZIKV. Nesse contexto, será importante avaliar se a combinação de drogas neuroprotetoras e antivirais poderão constituir um tratamento ideal para a infecção congênita pelo ZIKV.

Como conclusão, os resultados desse trabalho (Figura 44) demonstram que a infecção congênita pelo ZIKV induz diversos defeitos de nascimento da prole, desde a fase embrionária até a idade adulta. Essas consequências são potencializadas pelos

fenômenos de ADE e associadas com uma AIM exacerbada. A administração terapêutica de um peptídeo antiviral preveniu a disseminação do ZIKV para o feto e reduziu as taxas de mortalidade fetal induzidas pela infecção congênita pelo ZIKV. Em conjunto, esses resultados sugerem que a AIM e o ADE são possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da SCZ e fornecem conhecimentos adicionais sobre as consequências a longo prazo da infecção materna pelo ZIKV no início do período gestacional. Finalmente, esses resultados sugerem que tratamentos antivirais, como a terapia com o peptídeo AH-D, podem ser benéficas durante a infecção materna pelo ZIKV no período inicial da gestação.

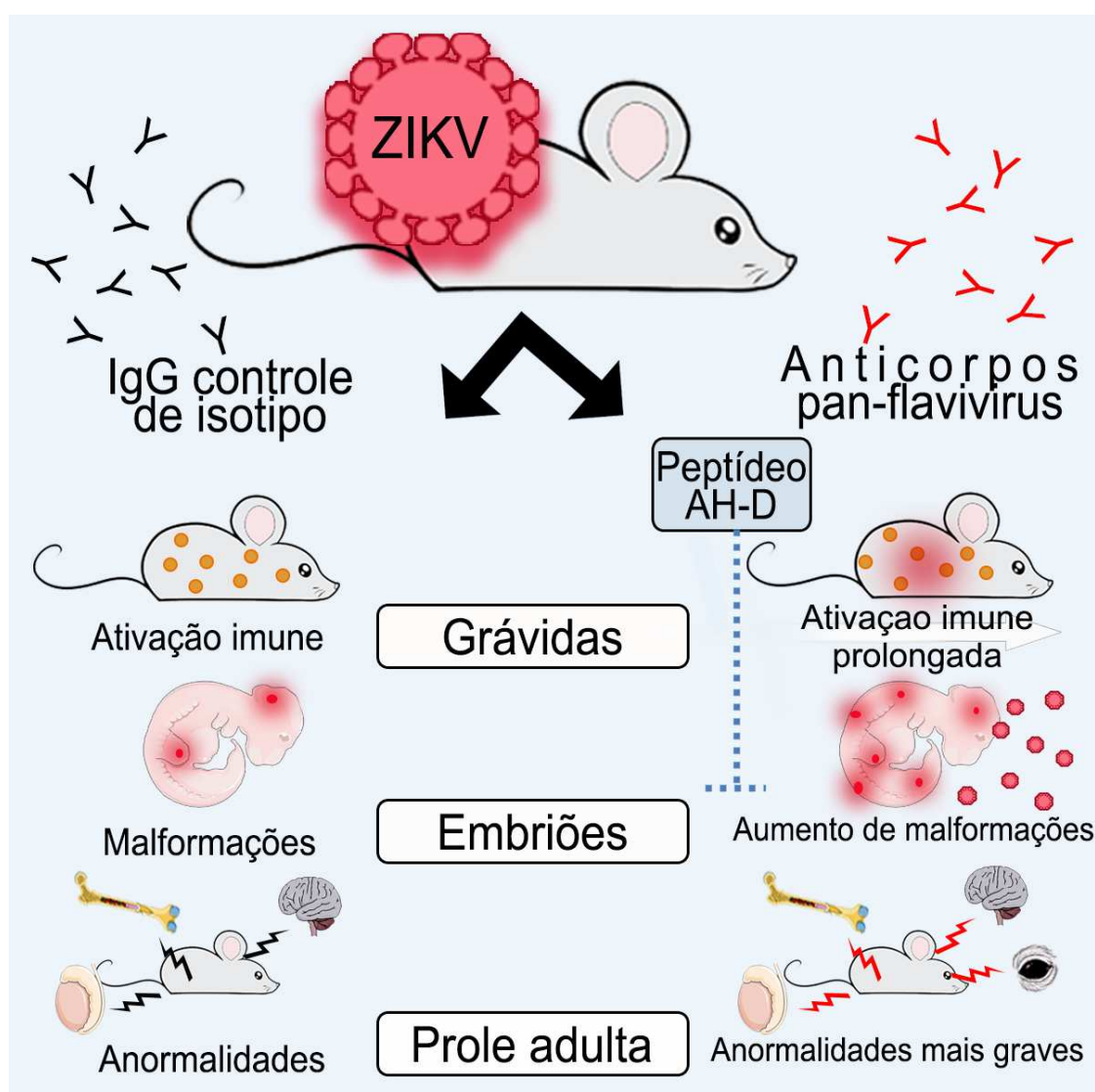


Figura 44: Representação esquemática dos principais achados do estudo. A infecção materna pelo ZIKV causa diversas alterações em camundongos imunocompetentes (lado esquerdo da figura), tanto nas mães durante a gestação, como também na prole jovem e adulta. A administração de anticorpos pan-flavivirus (lado direito da figura) exacerba algumas alterações resultantes da infecção pelo ZIKV. Além disso, a terapia com o peptídeo AH-D foi capaz de reduzir algumas alterações fetais provocadas pela infecção pelo ZIKV na presença de anticorpos pan-flavivirus.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-MAJID, K. B. et al. Fc receptors are critical for autoimmune inflammatory damage to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, n. 1, p. 70–81, 2002.

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. **The Anatomical Record**, 1946.

AGRAWAL, R. et al. Zika Virus and Eye. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 00, n. 00, p. 1–6, 2017.

ALIOTA, M. T. et al. Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–11, 2016.

ALVINO, A. C. M. I.; MELLO, L. R. M. DE; OLIVEIRA, J. DO A. M. M. DE. Association of arthrogryposis in neonates with microcephaly due to Zika virus - a case serie. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 16, n. suppl 1, p. S83–S88, 2016.

AMANN, R. P. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. **American Journal of Anatomy**, v. 110, n. 1, p. 69–78, 1962.

AMRAOUI, F. et al. Culex mosquitoes are experimentally unable to transmit zika virus. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 35, p. 1–4, 2016.

ANGOÁ-PÉREZ, M. et al. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 82, p. 50978, 2013.

ARAGAO, M. F. V. V. et al. Nonmicrocephalic infants with congenital zika syndrome suspected only after neuroimaging evaluation compared with those with microcephaly at birth and postnatally: How large is the Zika virus “iceberg”? **American Journal of Neuroradiology**, v. 38, n. 7, p. 1427–1434, 2017.

ARRODE-BRUSÉS, G.; BRUSÉS, J. L. Maternal immune activation by poly(I:C) induces expression of cytokines IL-1 β and IL-13, chemokine MCP-1 and colony stimulating factor VEGF in fetal mouse brain. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 83, 2012.

ARSENAULT, D. et al. The different effects of LPS and poly I: C prenatal immune challenges on the behavior, development and inflammatory responses in pregnant mice and their offspring. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 38, p. 77–90, 2014.

ATKINSON, B. et al. Detection of zika virus in semen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 940, 2016.

BADANI, H.; GARRY, R. F.; WIMLEY, W. C. Peptide entry inhibitors of enveloped viruses: The importance of interfacial hydrophobicity. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 9, p. 2180–2197, 2014.

BARAN, L. C. P. et al. Alterations in visual acuity and visual development in infants 1-

24 months old either exposed to or infected by Zika virus during gestation, with and without microcephaly. **Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus**, 2019.

BARDINA, S. V. et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antinflavivirus immunity. **Science**, v. 356, n. 6334, p. 175–180, 2017.

BARROS, J. B. DE S. et al. Acute Zika virus infection in an endemic area shows modest proinflammatory systemic immunoactivation and cytokine-symptom associations. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, p. 1–11, 2018.

BAYER, A. et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 705–712, 2016.

BAYLESS, N. L. et al. Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 4, p. 423–428, 2016.

BEARCROFT, W. G. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1956.

BELL, T. M.; FIELD, E. J.; NARANG, H. K. Zika virus infection of the central nervous system of mice. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, v. 35, n. 2–3, p. 183–193, 1971.

BEN-YEHUDA, H. et al. Maternal Type-I interferon signaling adversely affects the microglia and the behavior of the offspring accompanied by increased sensitivity to stress. **Molecular Psychiatry**, p. 1050–1067, 2019.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, p. no pagination-no pagination, 2014.

BIERLAIRE, D. et al. Virus ZIKA en Polynésie française : hémovigilance receveur. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 21, n. 4–5, p. 234, 2014.

BITANHIRWE, B. K. Y. et al. Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 117, n. 2–3, p. 273–274, 2010.

BOONNAK, K. et al. Human Fc RII Cytoplasmic Domains Differentially Influence Antibody-Mediated Dengue Virus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 11, p. 5659–5665, 2013.

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J.Bone Miner.Res.**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.

BRADLEY, M. P.; NAGAMINE, C. M. Animal models of Zika virus. **Comparative**

Medicine, v. 67, n. 3, p. 242–252, 2017.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 4 mar. 2016.

BREITBACH, M. E. et al. Primary infection with dengue or Zika virus does not affect the severity of heterologous secondary infection in macaques. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 8, p. e1007766, 2019.

BROUTET, N. et al. Zika Virus as a Cause of Neurologic Disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1506–1509, 2016.

BROWN, A. S. et al. Prenatal rubella, premorbid abnormalities, and adult schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 6, p. 473–486, 2001.

BROWN, J. A. et al. Dengue Virus Immunity Increases Zika Virus-Induced Damage during Pregnancy. **Immunity**, v. 50, n. 3, p. 751–762.e5, 2019.

BUKA, S. et al. Maternal infections and subsequent psychosis among offspring. **Archives of General Psychiatry**, v. 58, n. 11, p. 1032–1037, 1 nov. 2001.

BYERS, S. L. et al. Mouse estrous cycle identification tool and images. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–5, 2012.

CALCIA, M. A. et al. Stress and neuroinflammation: A systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 9, p. 1637–1650, 2016.

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**, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.

CAMARGOS, V. N. et al. In-depth characterization of congenital Zika syndrome in immunocompetent mice: Antibody-dependent enhancement and an antiviral peptide therapy. **EBioMedicine**, v. 44, p. 516–529, 2019.

CAMPOS, G.; BANDEIRA, A.; SARDI, S. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1881, 2015.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 11, p. 1960, 2014.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.

CAO, S.; STANDAERT, D. G.; HARMS, A. S. The gamma chain subunit of Fc receptors is required for alpha-synuclein-induced pro-inflammatory signaling in microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 1, 2012.

CASTANHA, P. M. S. et al. Enhancement of Zika infection by dengue-specific antibodies does not alter the production of interleukin 6 in FcγRII-expressing K562 cells. **Journal of Infectious Diseases**, 2017.

CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: A retrospective study. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 2016.

CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KALAYANAROOJ, S.; UBOL, S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 2, p. 365–375, 2007.

CHEN, J. et al. AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 302–309, 2018.

CHEN, W. et al. Osteoblasts from osteoarthritis patients show enhanced susceptibility to Ross River virus infection associated with delayed type I interferon responses. **Virology journal**, v. 11, n. 1, p. 189, 2014a.

CHEN, W. et al. Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 16, p. 6040–6045, 2014b.

CHEN, W. et al. Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein Synthesis, Protects against Bone Loss Induced by Chikungunya Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 89, n. 1, p. 581–593, 2015.

CHIRAMEL, A. I.; BEST, S. M. Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis. **Virus Research**, v. 254, n. September 2017, p. 34–40, 2018.

CHO, N. J. et al. Employing an amphipathic viral peptide to create a lipid bilayer on Au and TiO₂. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 33, p. 10050–10051, 2007.

CHO, N. J. et al. Mechanism of an amphipathic α-helical peptide's antiviral activity involves size-dependent virus particle lysis. **ACS Chemical Biology**, v. 4, n. 12, p. 1061–1067, 2009.

CHOI, G. B. et al. The maternal ROR γ t / IL-17a pathway promotes autism-like phenotypes in offspring. **Science**, v. 352, n. 6276, p. 933–940, 2016.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–11, 2016.

CLANCY, C. S. et al. Comparative Histopathologic Lesions of the Male Reproductive Tract during Acute Infection of Zika Virus in AG129 and *Ifnar*^{-/-} Mice. **American Journal of Pathology**, v. 188, n. 4, p. 904–915, 2018.

CLARKE, M. C. et al. Evidence for an interaction between familial liability and prenatal exposure to infection in the causation of schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 166, n. 9, p. 1025–1030, 2009.

COSTA, V. V. et al. Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection induces severe disease in immunocompetent mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 203, n. 4, p. 231–250, 2014.

COSTA, V. V. et al. N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor blockade prevents neuronal death induced by Zika virus infection. **mBio**, v. 8, n. 2, p. e00350-17, maio 2017.

COULOMBIER, D. et al. **Rapid risk assessment: Microcephaly in Brazil potentially linked to the Zika virus epidemic.**

COYNE, C. B.; LAZEAR, H. M. Zika virus-reigniting the TORCH. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 11, p. 707–715, 2016.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. **Model organisms: The ascent of mouse: Advances in modelling human depression and anxiety** **Nature Reviews Drug Discovery**, 2005.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016.

CULSHAW, A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. The immunology of Zika Virus. **F1000Research**, v. 7, n. 0, p. 203, 2018.

CUNHA, M. S. et al. First complete genome sequence of the Zika virus released. **ScienceDaily**, v. 4, n. 2, p. 2015–2016, 2016.

D'ORTENZIO, E. et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, 2016.

DA SILVEIRA, V. T. et al. Effects of early or late prenatal immune activation in mice on behavioral and neuroanatomical abnormalities relevant to schizophrenia in the adulthood. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 58, p. 1–8, 2017.

DANG, J. et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 258–265, 2016.

DE ARAÚJO, T. V. B. 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**, v. 18, n. 3, p. 328–336, 2018.

DE CASTRO, B. M. et al. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 8, n. 1, p.

23–35, 2009.

DE LIMA CAMPOS, T. et al. Revisiting key entry routes of human epidemic arboviruses into the mainland Americas through large-scale phylogenomics. **International Journal of Genomics**, v. 2018, 2018.

DE OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Congenital Zika virus infection: Beyond neonatal microcephaly. **JAMA Neurology**, v. 73, n. 12, p. 1407–1416, 2016.

DE PAULA FREITAS, B. et al. Ocular findings in infants with microcephaly associated with presumed Zika virus congenital infection in Salvador, Brazil. **JAMA Ophthalmology**, v. 134, n. 5, p. 529–535, 2016.

DE PAULA FREITAS, B. et al. Glaucoma and Congenital Zika Syndrome. **Ophthalmology**, v. 124, n. 3, p. 407–408, 2017a.

DE PAULA FREITAS, B. et al. Anterior-Segment Ocular Findings and Microphthalmia in Congenital Zika Syndrome. **Ophthalmology**, v. 124, n. 12, p. 1876–1878, 1 dez. 2017b.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. **Nature Immunology**, v. 17, n. 9, p. 1102–1108, 2016.

DESLAURIERS, J. et al. A two-hit model of suicide-trait-related behaviors in the context of a schizophrenia-like phenotype: Distinct effects of lithium chloride and clozapine. **Physiology and Behavior**, 2016.

DIALLO, D. et al. Zika virus emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 4–11, 2014.

DICK, G. W. A. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1952.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DONG, S.; LIANG, Q. Recent Advances in Animal Models of Zika Virus Infection. **Virologica Sinica**, v. 33, n. 2, p. 125–130, 2018.

DONOFRIO, P. D. **Guillain-Barré Syndrome** **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology** Elsevier Ltd, , 2017. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00339-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00339-1)>

DOWALL, S. D. et al. A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1–13, 2016.

DUDLEY, D. M. et al. Miscarriage and stillbirth following maternal Zika virus infection in nonhuman primates. **Nature Medicine**, v. 24, n. 8, p. 1104–1107, 2018.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 2536–2543, 2009.

DUGGAL, N. K. et al. Sexual transmission of Zika virus enhances in utero transmission in a mouse model. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018.

ECDC. Zika virus transmission worldwide. **European Centre for Disease Prevention and Control**, n. April, p. 21, 2019.

ECKERLE, I. et al. Emerging souvenirs—clinical presentation of the returning traveller with imported arbovirus infections in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 3, p. 240–245, 2018.

ENAYATI, M. et al. Maternal infection during late pregnancy increases anxiety- and depression-like behaviors with increasing age in male offspring. **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 2–3, p. 295–302, 2012.

ESTES, M. L.; MCALLISTER, A. K. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 772–777, 2016.

FAGBAMI, A. H. et al. Cross-infection enhancement among African flaviviruses by immune mouse ascitic fluids. **Cytobios**, v. 49, n. 196, p. 49–55, 1987.

FAGUNDES, C. T. et al. Therapeutic opportunities in dengue infection. **Drug Development Research**, v. 72, n. 6, p. 480–500, 2011.

FAIÇAL, A. V. et al. Neurodevelopmental delay in normocephalic children with in utero exposure to Zika virus. **BMJ Paediatrics Open**, v. 3, n. 1, p. e000486, 2019.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014.

FEIGENSON, K. A.; KUSNECOV, A. W.; SILVERSTEIN, S. M. Inflammation and the two-hit hypothesis of schizophrenia. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 38, p. 72–93, 2014.

FERNANDES, R. S. et al. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2016.

FERNANDEZ-VIZARRA, P. et al. Immunoglobulin G Fc receptor deficiency prevents Alzheimer-like pathology and cognitive impairment in mice. **Brain**, v. 135, n. 9, p. 2826–2837, 2012.

FITZGERALD, B.; BOYLE, C.; HONEIN, M. A. Birth Defects Potentially Related to Zika Virus Infection During Pregnancy in the United States. **Jama**, v. 319, n. 12, p. 1195–

1196, 2018.

FOUREAUX, G. et al. Ocular inserts for sustained release of the angiotensin-converting enzyme 2 activator, diminazene aceturate, to treat glaucoma in rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–18, 2015a.

FOUREAUX, G. et al. Activation of endogenous angiotensin converting enzyme 2 prevents early injuries induced by hyperglycemia in rat retina. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 12, p. 1109–1114, 2015b.

FOURIE, T. et al. Variability of zika virus incubation period in humans. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 5, n. 11, p. 1–4, 2018.

FOY, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

FRÉOUR, T. et al. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 23, p. 8–10, 2016.

GARCEZ, P. P. et al. Zika virus: Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**, v. 352, n. 6287, p. 816–818, 2016a.

GARCEZ, P. P. et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**, v. 352, n. 6287, p. 816–818, maio 2016b.

GARCIA-BLANCO, M. A. et al. Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. **Antiviral Research**, v. 134, p. 244–249, 2016.

GILMORE, J. H. et al. Prenatal infection and risk for schizophrenia: IL-1 β , IL-6, and TNF α inhibit cortical neuron dendrite development. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 7, p. 1221–1229, 2004.

GIOVANOLI, S. et al. Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. **Science**, v. 339, n. 6123, p. 1100–1102, 2013.

GIOVANOLI, S. et al. Preventive effects of minocycline in a neurodevelopmental two-hit model with relevance to schizophrenia. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. September 2015, 2016.

GOLAN, H. M. et al. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 6, p. 903–917, 2005.

GOVERO, J. et al. Zika virus infection damages the testes in mice. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 438–442, 2016.

GRAHAM, A. M. et al. Maternal Systemic Interleukin-6 During Pregnancy Is Associated With Newborn Amygdala Phenotypes and Subsequent Behavior at 2 Years of Age.

Biological Psychiatry, v. 83, n. 2, p. 109–119, 2018.

GRÄSLUND, A. et al. **Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides** *Journal of Biophysics*, 2011.

GRIFONI, A. et al. Prior Dengue virus exposure shapes T cell immunity to Zika virus in humans. **Journal of Virology**, n. October, p. JVI.01469-17, 2017.

GUEDES, D. R. D. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 8, 2017.

GULLAND, A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 352, n. February, p. i657, 2016.

GUO, X. X. et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: A potential vector to transmit Zika virus. **Emerging Microbes and Infections**, v. 5, n. 9, p. e102-5, 2016.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 2015.

HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.

HALAI, U. A. et al. Maternal Zika virus disease severity, virus load, prior dengue antibodies, and their relationship to birth outcomes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 6, p. 877–883, 2017.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015a.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015b.

HASTINGS, A. K. et al. TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. **Cell Reports**, v. 19, n. 3, p. 558–568, 2017.

HERMANNNS, K. et al. Zika virus infection in human placental tissue explants is enhanced in the presence of dengue virus antibodies in-vitro. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, 2018.

HEYMANN, D. L. et al. Zika virus and microcephaly: Why is this situation a PHEIC? **The Lancet**, v. 387, n. 10020, p. 719–721, 2016.

HILLS, S. L. et al. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission — Continental United States, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, 2016.

HIRSCH, A. J. et al. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

HONEIN, M. A. et al. Birth defects among fetuses and infants of US women with

evidence of possible Zika virus infection during pregnancy. **Jama**, v. 317, n. 1, p. 59–68, 2017.

HSIAO, E. Y.; PATTERSON, P. H. Activation of the maternal immune system induces endocrine changes in the placenta via IL-6. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 4, p. 604–615, 2011.

HUANG, Y. L. et al. CLEC5A is critical for dengue virus-induced osteoclast activation and bone homeostasis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 94, n. 9, p. 1025–1037, 2016.

HUESTON, L.; RAMIREZ, R.; MAHALINGAM, S. Enhancement of Zika infection by dengue virus-specific antibody is associated with low levels of antiviral factors. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 5, p. 612–614, 2017.

JACKMAN, J. A. et al. Therapeutic treatment of Zika virus infection using a brain-penetrating antiviral peptide. **Nature Materials**, p. 1, 2018.

JACKMAN, J. A.; SHI, P.-Y.; CHO, N.-J. Targeting the Achilles Heel of Mosquito-Borne Viruses for Antiviral Therapy. **ACS Infectious Diseases**, p. acsinfecdis.8b00286, 2018.

JOGUET, G. et al. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1200–1208, 2017.

JOHNSON, L.; NEAVES, W. B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules and sperm production in stallions. **Biology of Reproduction**, v. 24, p. 703–712, 1981.

JULANDER, J. G. et al. Consequences of in utero exposure to Zika virus in offspring of AG129 mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9384, 2018.

KATZELNICK, L. C. et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 929–932, 2017.

KNUESEL, I. et al. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 11, p. 643–660, 2014.

KOMINE-KOBAYASHI, M. et al. Dual role of Fcγ receptor in transient focal cerebral ischemia in mice. **Stroke**, v. 35, n. 4, p. 958–963, 2004.

KUMAR, A. et al. Human sertoli cells support high levels of zika virus replication and persistence. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

KURSCHEIDT, F. A. et al. Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. **Nature Reviews Urology**, v. 16, n. 4, p. 211–230, 2019.

LANCIOTTI, R. S. et al. Phylogeny of zika virus in western Hemisphere, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, 2016.

LANGERAK, T. et al. The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 4, p. e1007640, 2019.

LAZEAR, H.; DIAMOND, M. Zika Virus : New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. **Journal of Virology**, v. 90, n. 10, p. 4864–4875, 2016.

LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 720–730, 2016.

LI, C. et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 1, p. 120–126, 2016.

LI, F. et al. AXL is not essential for Zika virus infection in the mouse brain. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 3, p. e16, 2017.

LI, M. et al. Dengue immune sera enhance Zika virus infection in human peripheral blood monocytes through Fc gamma receptors. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–23, 2018.

LI, Q. et al. Prenatal immune challenge is an environmental risk factor for brain and behavior change relevant to schizophrenia: Evidence from MRI in a mouse model. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, 2009.

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

LIU, S. et al. AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. **Circulation Research**, v. 119, n. 11, p. 1183–1189, 2016.

LIU, Y. et al. Inflammation-Induced, STING-Dependent Autophagy Restricts Zika Virus Infection in the Drosophila Brain. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 1, p. 57- 68.e3, 2018.

LOCKROW, J.; TULLY, H.; SANETO, R. P. Epileptic spasms as the presenting seizure type in a patient with a new “O” of TORCH, congenital Zika virus infection. **Epilepsy and Behavior Case Reports**, v. 11, p. 1–3, 2019.

LUCCHESI, G.; KANDUC, D. Zika virus and autoimmunity: From microcephaly to Guillain-Barré syndrome, and beyond. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 8, p. 801–808, 2016.

LUM, F. M. et al. Longitudinal study of cellular and systemic cytokine signatures to define the dynamics of a balanced immune environment during disease manifestation in zika virus–infected patients. **Journal of Infectious Diseases**, 2018.

LYDEN, T. W. et al. The Fc receptor for IgG expressed in the villus endothelium of human placenta is Fc gamma RIIB2. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 6, p. 3882–3889, 2001.

MA, W. et al. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice.

Cell, v. 167, n. 6, p. 1511- 1524.e10, 2016.

MACARI, S. et al. Osteoprotective effects of estrogen in the maxillary bone depend on ER α . **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 6, p. 689–696, 2016.

MACARI, S. et al. Lactation induces increases in the RANK/RANKL/OPG system in maxillary bone. **Bone**, v. 110, p. 160–169, 2018.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.

MAIDJI, E. et al. Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. **American Journal of Pathology**, v. 168, n. 4, p. 1210–1226, 2006.

MALLET, H.-P.; VIAL, A.-L.; MUSSO, D. Bilan De L'Epidemie a Virus Zika En Polynesie Francaise, 2013-2014. **Bulletin d'information sanitaires, epidemiologiques et statistiques**, v. 13, p. 1–8, 2015.

MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 1969.

MARQUEZAN, M. C. et al. Ocular effects of Zika virus-a review. **Survey of Ophthalmology**, p. 21, 2017.

MASSAD, E. et al. On the origin and timing of Zika virus introduction in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 11, p. 2303–2312, 2017.

MATUSALI, G. et al. Zika virus infects human testicular tissue and germ cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 10, p. 4697–4710, 2018.

MCCARTHY, M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 352, n. February, p. i720, 2016.

MCCRACKEN, M. K. et al. Impact of prior flavivirus immunity on Zika virus infection in rhesus macaques. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, p. 1–22, 2017.

MEERTENS, L. et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. **Cell Reports**, v. 18, n. 2, p. 324–333, 2017.

MENNINGER, K. A. Psychoses Associated With Influenza, I: General Data: Statistical Analysis. **Jama**, v. 72, n. (4), p. 235–241, 25 jan. 1919.

MEYER, U. et al. The Time of Prenatal Immune Challenge Determines the Specificity of Inflammation-Mediated Brain and Behavioral Pathology. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 18, p. 4752–4762, 2006.

MEYER, U. Prenatal Poly(I:C) exposure and other developmental immune activation

models in rodent systems. **Biological Psychiatry**, v. 75, n. 4, p. 307–315, 2014.

MINER, J. J. et al. Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. **Cell Reports**, v. 16, n. 12, p. 3208–3218, 2016a.

MINER, J. J. et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081–1091, 2016b.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 2, p. 134–142, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE. Protocolo de Vigilância e Resposta À Microcefalia Relacionada À Infecção Pelo Vírus Zika. **Versão 1.2 - 09/12/2015**, p. 70, 2015.

MIRANDA, H. A. DE et al. Expanded Spectrum of Congenital Ocular Findings in Microcephaly with Presumed Zika Infection. **Ophthalmology**, v. 123, n. 8, p. 1788–1794, 2016.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016.

MODHIRAN, N.; KALAYANAROOJ, S.; UBOL, S. Subversion of innate defenses by the interplay between DENV and pre-existing enhancing antibodies: TLRs signaling collapse. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–12, 2010.

MOHR, E. L. et al. Ocular and uteroplacental pathology in a macaque pregnancy with congenital Zika virus infection. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–28, 2018.

MOORE, C. A. et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 3, p. 288–295, 2017.

MOR, G. Placental Inflammatory Response to Zika Virus may Affect Fetal Brain Development. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 75, n. 4, p. 421–422, 2016.

MORRISON, T. E.; DIAMOND, M. S. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. **Journal of Virology**, 2017.

MULKEY, S. B. et al. Neuroimaging Findings in Normocephalic Newborns With Intrauterine Zika Virus Exposure. **Pediatric Neurology**, v. 78, p. 75–78, 2018.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.

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

NAKAHARA, J. et al. Expression of Fc receptor for immunoglobulin M in oligodendrocytes and myelin of mouse central nervous system. **Neuroscience**

Letters, 2003.

NEM DE OLIVEIRA SOUZA, I. et al. Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 444, p. eaar2749, 2018.

NICASTRI, E. et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 32, p. 1–4, 2016.

NIELSEN-SAINES, K. et al. Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children. **Nature Medicine**, 2019.

NIMMERJAHN, F. Translating Inhibitory Fc Receptor Biology into Novel Therapeutic Approaches. **Journal of Clinical Immunology**, v. 36, p. 83–87, 2016.

NOWAKOWSKI, T. J. et al. Expression analysis highlights AXL as a candidate zika virus entry receptor in neural stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 591–596, 2016.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 9, p. 7–9, 2014.

OJHA, C. R. et al. Complementary mechanisms potentially involved in the pathology of Zika virus. **Frontiers in Immunology**, 2018.

OKUN, E.; MATTSON, M. P.; ARUMUGAM, T. V. Involvement of Fc Receptors in Disorders of the Central Nervous System. **Neuromolecular medicine**, v. 12, n. 2, p. 164–178, 2010.

OLIVEIRA, D. B. L. et al. Prolonged shedding of Zika virus associated with congenital infection. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 12, p. 1202–1204, 2016.

OLMO, I. G. et al. Zika virus promotes neuronal cell death in a non-cell autonomous manner by triggering the release of neurotoxic factors. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. AUG, p. 1–14, 2017.

PAGE, M.; THORPE, R. Purification of monoclonal antibodies. In: **Immunochemical Protocols**. [s.l.] Springer, 1998. p. 113–119.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANISATION. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. **Pan American Health Organization**, 2015.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological update. Neurological syndrome, congenital anomalies, and Zika virus infection. 17 January 2016. **World Health Organization**, 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015-2018. Cumulated cases. Data as of 04 January 2018. **Pan American Health Organization**, n. October, p. 2016, 2018.

PANTOJA, P. et al. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

PATTERSON, P. H. Immune involvement in schizophrenia and autism: Etiology, pathology and animal models. **Behavioural Brain Research**, v. 204, n. 2, p. 313–321, 2009.

PAUL, L. M. et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 12, p. e117, 2016.

PAUS, T.; KESHAVAN, M.; GIEDD, J. N. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 12, p. 947–957, 2008.

PEREZ-GARCIA, V. et al. Placentation defects are highly prevalent in embryonic lethal mouse mutants. **Nature**, v. 555, n. 7697, p. 463–468, 2018.

PERSAUD, M. et al. Infection by Zika viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. **Virology**, v. 518, n. March, p. 301–312, 2018.

PESSOA, R. et al. Investigation into an outbreak of dengue-like illness in pernambuco, Brazil, revealed a cocirculation of Zika, Chikungunya, and dengue virus type 1. **Medicine (United States)**, v. 95, n. 12, p. 1–9, 2016.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 2016.

PETERSEN, L. R.; BUSCH, M. P. Transfusion-transmitted arboviruses. **Vox Sanguinis**, v. 98, n. 4, p. 495–503, 2010.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796–812, 2020.

POKIDYSHEVA, E. et al. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 485–493, 2006.

QUICKE, K. M. et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. **Cell Host and Microbe**, v. 20, n. 1, p. 83–90, 2016.

RADYUSHKIN, K. et al. Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. **Genes, Brain and Behavior**, v. 8, n. 4, p. 416–425, jun. 2009.

RAMOS DA SILVA, S.; GAO, S. J. Zika virus: An update on epidemiology, pathology, molecular biology, and animal model. **Journal of Medical Virology**, 2016.

RASMUSSEN, S. A. et al. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 20, p. 1981–1987, 2016.

RATHORE, A. P. S. et al. Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus–induced microcephaly in fetuses. **Science Advances**, 2019.

RATHORE, A. P. S.; ST. JOHN, A. L. Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1–9, 2020.

RAUSCH, K. et al. Screening Bioactives Reveals Nanchangmycin as a Broad Spectrum Antiviral Active against Zika Virus. **Cell Reports**, v. 18, n. 3, p. 804–815, 2017.

RETALLACK, H. et al. Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 50, p. 14408–14413, 2016.

RIBEIRO, G. S. et al. Does immunity after Zika virus infection cross-protect against dengue? **The Lancet Global Health**, v. 6, n. 2, p. e140–e141, 2018.

RICHARD, A. S. et al. AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 8, p. 2024–2029, 2017.

ROBINSON, C. L. et al. Male germ cells support long-term propagation of Zika virus. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2018.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. et al. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. **Science**, v. 363, n. 6427, p. 607 LP – 610, 8 fev. 2019.

ROGERS, T. F. et al. Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. **Science Immunology**, v. 2, n. 14, p. eaan6809, 2017.

ROIMICHER, L. et al. Zika virus in the joint of a patient with rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 44, n. 4, p. 535, 2017.

ROMBI, F. et al. The journey of Zika to the developing brain. **Molecular Biology Reports**, n. 0123456789, 2020.

ROOPENIAN, D. C.; AKILESH, S. FcRn: The neonatal Fc receptor comes of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 715–725, 2007.

ROSE, D. R. et al. Long-term altered immune responses following fetal priming in a non-human primate model of maternal immune activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 63, p. 60–70, 2017.

ROSSI, S. L. et al. Characterization of a novel murine model to study zika virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1362–1369,

2016.

RUDOLPH, M. D. et al. Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. **Nature Neuroscience**, p. 1–8, 2018.

RUSSELL, K. et al. Male-to-female sexual transmission of zika virus-United States, January-April 2016. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 211–213, 2017.

SAGER, G. et al. Role of host cell secretory machinery in zika virus life cycle. **Viruses**, 2018.

SAJI, F. et al. Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. **Reviews of reproduction**, v. 4, n. 2, p. 81–89, 1999.

SAPPARAPU, G. et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 443–447, 2016.

SATTERFIELD-NASH, A. et al. Health and Development at Age 19–24 Months of 19 Children Who Were Born with Microcephaly and Laboratory Evidence of Congenital Zika Virus Infection During the 2015 Zika Virus Outbreak — Brazil, 2017. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 49, p. 1347–1351, 2017.

SAÚDE, M. DA. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika ate a Semana Epidemiologica 52, 2017. **Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde**, 2018.

SAÚDE, M. DA. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. **Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde**, 2019. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>>

SAÚDE, M. DA. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. **Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde**, 2020a.

SAÚDE, M. DA. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 19, 2020. **Boletim Epidemiológico Arboviroses**, v. 51, n. 20, 2020b.

SCHMUED, L. C. et al. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Research**, v. 1035, n. 1, p. 24–31, 2005.

SHAN, C. et al. A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

SHI, Y. et al. Vertical Transmission of the Zika Virus Causes Neurological Disorders in Mouse Offspring. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

SHIM, J. HYUCK; STAVRE, Z.; GRAVALLESE, E. M. Bone Loss in Rheumatoid Arthritis: Basic Mechanisms and Clinical Implications. **Calcified Tissue International**, v. 102, n. 5, p. 533–546, 2018.

SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, n. 6284, p. 467–70, 2016.

SMITH, S. E. P. et al. Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 40, p. 10695–10702, 2007.

SONG, X. et al. Fcγ receptor signaling in primary human microglia: differential roles of PI-3K and Ras/ERK MAPK pathways in phagocytosis and chemokine induction. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 6, p. 1147–1155, 2004.

SOUSA, N.; ALMEIDA, O. F. X.; WOTJAK, C. T. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. **Genes, Brain and Behavior**, 2006.

SOUZA, I. N. O. et al. Late neurological consequences of zika virus infection: Risk factors and pharmaceutical approaches. **Pharmaceuticals**, 2019.

SPENCER, J. L. et al. Replication of Zika Virus in Human Prostate Cells: A Potential Source of Sexually Transmitted Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, 2017.

STASSEN, L. et al. Zika Virus in the Male Reproductive Tract. **Viruses**, v. 10, n. 4, p. 198, 2018.

STEINBACH, K. Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection induces severe disease in immunocompetent mice. **Creative Practices for Visual Artists: Time, Space, Process**, v. 203, n. 4, p. 1–108, 2018.

STRANGE, D. P. et al. Immunoprofiles of human Sertoli cells infected with Zika virus reveals unique insights into host-pathogen crosstalk. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

SUVISAARI, J. et al. Association between prenatal exposure to poliovirus infection and adult schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 7, p. 1100–1102, 1999.

SZABA, F. M. et al. Zika virus infection in immunocompetent pregnant mice causes fetal damage and placental pathology in the absence of fetal infection. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 4, p. e1006994, 2018.

TABATA, T. et al. Zika Virus Replicates in Proliferating Cells in Explants from First-Trimester Human Placentas, Potential Sites for Dissemination of Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 8, p. 1202–1213, 2018.

TAKEI, N. et al. Relationship between in utero exposure to influenza epidemics and risk of schizophrenia in Denmark. **Biological Psychiatry**, v. 40, n. 9, p. 817–824, 1996.

TANG, H. et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016.

TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 3, p. 269–273, 2016.

TERZIAN, A. C. B. et al. Viral load and cytokine response profile does not support antibody-dependent enhancement in Dengue-Primed Zika Virus-infected patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 8, p. 1260–1265, 2017.

UBOL, S. et al. Mechanisms of Immune Evasion Induced by a Complex of Dengue Virus and Preexisting Enhancing Antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 6, p. 923–935, 2010.

VENTURA, C. V et al. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 228, 2016a.

VENTURA, C. V et al. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 79, n. 1, p. 1–3, 2016b.

VERMILLION, M. S. et al. Intrauterine Zika virus infection of pregnant immunocompetent mice models transplacental transmission and adverse perinatal outcomes. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–14, 2017.

WANG, W. H. et al. An epidemiological survey of the current status of Zika and the immune interaction between dengue and Zika infection in Southern Taiwan. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 93, p. 151–159, 2020.

WANG, Y. **Vascular Biology of the Placenta**. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease. **Anais...Morgan & Claypool Life Sciences**, 2017

WANG, Z. Y. et al. Axl is not an indispensable factor for Zika virus infection in mice. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 8, p. 2061–2068, 2017.

WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, v. 130, p. 69–80, 2016.

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**, v. 52, n. 3, p. 263–268, 1958.

WELLS, M. F. et al. Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 6, p. 703–708, 2016.

WEN, J. et al. Dengue virus-reactive CD8+T cells mediate cross-protection against subsequent Zika virus challenge. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

WHO. **Countries and territories with current or previous Zika virus transmission**, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/countries-with-zika-and-vectors-table.pdf>>

WILDER-SMITH, A. et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. e101–e106, 2017.

WILLISON, H. J.; JACOBS, B. C.; VAN DOORN, P. A. Guillain-Barré syndrome. **The Lancet**, v. 388, n. 10045, p. 717–727, 2016.

WONG, C. W. et al. Zika-Related Maculopathy. **Retinal cases & brief reports**, 2017.

WU, K. Y. et al. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. **Cell Research**, v. 26, n. 6, p. 645–654, 2016.

XAVIER-NETO, J. et al. Hydrocephalus and arthrogryposis in an immunocompetent mouse model of ZIKA teratogeny: A developmental study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1–29, 2017.

YEPEZ, J. B. et al. Ophthalmic manifestations of congenital Zika syndrome in Colombia and Venezuela. **JAMA Ophthalmology**, v. 135, n. 5, p. 440–445, 2017.

YOCKEY, L. J. et al. Vaginal Exposure to Zika Virus during Pregnancy Leads to Fetal Brain Infection. **Cell**, v. 166, n. 5, p. 1247- 1256.e4, 2016.

YU, Y. et al. A peptide-based viral inactivator inhibits Zika virus infection in pregnant mice and fetuses. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

ZARE MEHRJARDI, M. et al. Neuroimaging findings of postnatally acquired Zika virus infection: a pictorial essay. **Japanese Journal of Radiology**, v. 35, n. 7, p. 341–349, 2017.

ZHOU, Y. et al. Dengue virus envelope protein domain III-elicited antibodies mediate cross-protection against Zika virus in a mouse model. **Virus Research**, v. 278, n. July 2019, p. 197882, 2020.

ZIMMERMAN, M. G. et al. Cross-Reactive Dengue Virus Antibodies Augment Zika Virus Infection of Human Placental Macrophages. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 5, p. 731- 742.e6, 2018.

ZIN, A. A. et al. Screening criteria for ophthalmic manifestations of congenital zika virus infection. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 9, p. 847–854, 2017.

ANEXO A – Artigo científico publicado em periódico indexado

EBioMedicine 44 (2019) 516–529



Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: www.ebiomedicine.com

Published by THE LANCET

Research paper

In-depth characterization of congenital Zika syndrome in immunocompetent mice: Antibody-dependent enhancement and an antiviral peptide therapy



Vidyleison N. Camargos^a, Giselle Foureaux^b, Daniel C. Medeiros^c, Vivian T. da Silveira^d, Celso M. Queiroz-Junior^b, Ana Luisa B. Matosinhos^d, André F.A. Figueiredo^e, Carla D.F. Sousa^a, Thaiane P. Moreira^a, Victória F. Queiroz^a, Ana Carolina F. Dias^a, Karina T.O. Santanaⁿ, Ingredy Passos^{n,o}, Ana Luíza C.V. Real^f, Ludmila C. Silva^b, Flávio A.G. Mourão^c, Natália T. Wnuk^e, Milton A.P. Oliveira^g, Soraia Macari^h, Tarclia Silvaⁱ, Gustavo P. Garlet^j, Joshua A. Jackman^k, Frederico M. Sorianiⁿ, Márcio F.D. Moraes^c, Eduardo M.A.M. Mendes^c, Fabíola M. Ribeiro^f, Guilherme M.J. Costa^e, Antônio L. Teixeira^l, Nam-Joon Cho^k, Antônio C.P. Oliveira^d, Mauro M. Teixeira^{m,n}, Vivian V. Costa^{n,o,*}, Danielle G. Souza^{a,*}

^a Host-Microorganism Interaction Lab, Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Transversal Biology Lab, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Centre for Technology and Research in Magnetic-Resonance, Graduate Program in Electrical Engineering, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Neuropharmacology Lab, Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Cellular Biology Lab, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^f Neurobiochemistry Lab, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^g Department of Microbiology, Immunology, Parasitology and Pathology, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^h Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, Faculty of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

ⁱ Department of Oral Pathology and Surgery, Faculty of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^j Department of Biological Sciences, School of Dentistry of Bauru, São Paulo University, Bauru, SP, Brazil

^k School of Materials Science and Engineering, Nanyang Technological University, Singapore

^l Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioural Sciences, McGovern Medical Houston, University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX, USA

^m Immunopharmacology Lab, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil

ⁿ Centre for Drug Research and Development of Pharmaceuticals, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil

^o Research Group in Arboviral Diseases, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2019

Received in revised form 27 April 2019

Accepted 7 May 2019

Available online 23 May 2019

Keywords:

Congenital Zika virus infection (CZI)

Congenital Zika Syndrome (CZS)

Maternal immune activation (MIA)

Antibody-dependent enhancement (ADE)

Short and long-term outcomes

ABSTRACT

Background: Zika virus (ZIKV) infection during pregnancy may cause major congenital defects, including microcephaly, ocular, articular and muscle abnormalities, which are collectively defined as Congenital Zika Syndrome. Here, we performed an in-depth characterization of the effects of congenital ZIKV infection (CZI) in immunocompetent mice.

Methods: Pregnant dams were inoculated with ZIKV on embryonic day 5.5 in the presence or absence of a sub-neutralizing dose of a pan-flavivirus monoclonal antibody (4G2) to evaluate the potential role of antibody-dependent enhancement phenomenon (ADE) during short and long outcomes of CZI.

Findings: ZIKV infection induced maternal immune activation (MIA), which was associated with occurrence of foetal abnormalities and death. Therapeutic administration of AH-D antiviral peptide during the early stages of pregnancy prevented ZIKV replication and death of offspring. In the post-natal period, CZI was associated with a decrease in whole brain volume, ophthalmologic abnormalities, changes in testicular morphology, and disruption in bone microarchitecture. Some alterations were enhanced in the presence of 4G2 antibody.

Interpretation: Our results reveal that early maternal ZIKV infection causes several birth defects in immunocompetent mice, which can be potentiated by ADE phenomenon and are associated with MIA. Additionally, antiviral treatment with AH-D peptide may be beneficial during early maternal ZIKV infection.

* Corresponding author at: Departamento de Morfologia and Departamento de Microbiologia, respectively, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail addresses: vivianvcosta@icb.ufmg.br (V.V. Costa), dani@icb.ufmg.br (D.G. Souza).

¹ Both are corresponding authors.

Fund: This work was supported by the Brazilian National Science Council (CNPq, Brazil), Minas Gerais Foundation for Science (FAPEMIG), Funding Authority for Studies and Projects (FINEP), Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES), National Research Foundation of Singapore and Centre for Precision Biology at Nanyang Technological University.

© 2019 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Zika virus (ZIKV) infection emerged as a global public health threat that is associated with severe neurological complications. ZIKV is an arbovirus that belongs to the *Flaviviridae* family and is mainly transmitted to humans through the bite of infected *Aedes* mosquitoes. Vertical transmission in humans can result in early miscarriage or mild to severe birth defects, which include visual and hearing impairment [1]. The most severe outcome after congenital ZIKV infection (CZI) is severe microceph-

aly and the long-term consequences of ZIKV infection has yet to be determined. The term Congenital Zika Syndrome (CZS) has been coined to describe the most significant and pathognomonic alterations observed after ZIKV infection of the foetus: microcephaly and one or more other complications, including vision and hearing impairment, as well as articular and musculoskeletal abnormalities [2,3].

Epidemiological and experimental studies suggest that maternal inflammation during pregnancy, due to infection or other causes, can elicit maternal immune system activation (MIA). MIA is considered a risk factor for neurodevelopmental and psychiatric disorders during adulthood, including schizophrenia, depression, and anxiety [4,5]. In this regard, CZS might not only be associated with the direct effects of the virus infection on the developing foetus but also to MIA in response to ZIKV infection, which could in turn trigger the development of several long-term harmful consequences and contribute to CZS pathogenesis [4].

Several hypotheses have been proposed to explain the relative frequent occurrence of CZS in the recent epidemics in Brazil, including the existence of environmental, socio-economic, and epidemiological factors [6,7]. In this context, one plausible hypothesis is the occurrence of antibody-dependent enhancement (ADE) of ZIKV infection [8]. This hypothesis, which remains to be proven, is based on the increased incidence of CZS in areas of co-circulation of ZIKV and all *Dengue virus* (DENV) serotypes during the latest epidemic that occurred in Brazil and the genomic similarity between those viruses. In this regard, it is also not known whether ADE could facilitate MIA occurrence.

Here, using an immunocompetent mouse model of CZI, we investigated the effects of ZIKV infection on embryonic development and its long-term consequences during adulthood. Our results reveal that early ZIKV exposure during pregnancy induces MIA, which is associated with foetal abnormalities in the offspring. Those effects during early neurodevelopment were followed by long-term consequences in adult offspring born from ZIKV-infected dams. We also demonstrate that acute and long-term functional consequences of infection were exacerbated in the presence of previous immunity, suggesting that ADE contributes to CZS aggravation in immunocompetent mice. Finally, therapeutic administration of a brain-penetrating antiviral peptide (AH-D) to ZIKV-infected dams resulted in reduction of viral loads in foetal brains and decreased the percentage of malformations in offspring, providing the first proof-of-concept that therapeutic treatment of pregnant women with antiviral compounds may alter the fate of ZIKV infection during pregnancy and prevent disease symptoms associated with CZS in offspring.

2. Material and methods

2.1. Virus, cell culture and antibodies

A contemporary ZIKV strain from Brazil (HS-2015-BA-01 accession no. KX520666), isolated from the serum of an infected patient in Bahia state, Brazil, was propagated in *Aedes albopictus* C6/36 cell line. Stock virus from cell culture and viral loads obtained from maternal plasma and spleen samples were titrated in Vero cells (<https://www.atcc.org/products/all/CCl-81.aspx>) as previously described [9]. Plaques were detected after five days of infection. Monoclonal antibody 4G2 hybridoma was acquired from ATCC (<https://www.atcc.org/Products/All/HB-112.aspx>), and a mouse IgG2a isotype control mAb from Acris GmbH was

Research in context

Evidence before this study

It is known that *Zika virus* (ZIKV) infection during pregnancy can cause several birth defects to developing foetuses, and this disease state is termed Congenital Zika Syndrome (CZS). However, few studies have begun to investigate the potential long-term outcomes of affected offspring and possible pathogenic mechanisms. In addition, maternal immune activation (MIA) during pregnancy is associated with the development of neuropsychiatric diseases of offspring during adulthood. Thus, consequences of congenital ZIKV infection might not only be caused by pathological effects of the virus infection, but also due to maternal inflammatory mechanisms. Finally, a novel antiviral peptide called AH-D showed therapeutic activity against ZIKV *in vivo*. Therefore, the peptide's antiviral activity should be further tested in other pre-clinical models to evaluate its potential therapeutic use.

Added value of this study

Here, we demonstrated that ZIKV infection in immunocompetent mice induced relevant maternal and foetal abnormalities, which worsened in the presence of anti-flavivirus antibodies. During the post-natal period, several alterations in the offspring of ZIKV-infected dams were detected, some of which were enhanced by previous flavivirus immunity and affected several systems such as the brain, eyes, testes, and bones. Finally, we provided further evidence that AH-D peptide therapy can abrogate ZIKV replication *in vivo* during pregnancy and ameliorated foetal abnormalities caused by ZIKV infection.

Implications of all the available evidence

Our findings highlight several short- and long-term consequences of congenital ZIKV infection, which could be potential clinical outcomes that might be expected in individuals born from ZIKV-infected mothers, and finally support the feasibility of an antiviral peptide therapy to prevent adverse pregnancy outcomes induced by ZIKV infection. Taken together, the current results suggest that the general population and clinicians should remain vigilant of long-term, potentially harmful symptoms that may afflict apparently healthy children who were born from ZIKV-infected mothers.

used as a control. Antibodies used in immunostaining assays included anti-caspase-3 (Abcam 13585 1:200 for brain and retina analyses; Abcam IM-0035 1:100 for testicular analysis), anti-Iba-1/AIF1 (PA5–21274), Fluoro-Jade C® (Merk Millipore AG325), anti-NeuN (Abcam 104225), and anti-S100B (Abcam 41548).

2.2. Mouse experiments

C57BL/6 mice (8–12 weeks) were set up for timed-mating and inoculated at embryonic day (ED) 5.5 with 10^6 PFU/mouse of ZIKV or PBS (control) intraperitoneally (i.p.) [10]. To evaluate the role of ADE in ZIKV infection, 10 µg of 4G2 or IgG2a (control group) were injected intraperitoneally (i.p.) 24 h before ZIKV infection and every 48 h after the first dose in accordance with Costa et al. [9].

For MIA assays, baseline blood samples from pregnant dams were collected 24 h prior to infection and at 2 h and 24 h post infection (as described in Fig. 1), with spleen collection at the last time point (24 h). For embryonic analyses, pregnant dams were euthanized on ED 15.5 for maternal and foetal tissue extraction (as described in Fig. 2). For evaluating long-term effects, offspring were euthanized 12 weeks after birth (as described in Fig. 3). To evaluate the AH-D peptide therapy, the peptide (25 mg/kg via i.p. route) was administered daily (as described in Fig. 7). Results shown are representative of at least 4 to 6 independent experiments in which at least one dam from each of the three experimental groups (PBS, ZIKV, and 4G2 + ZIKV) were performed simultaneously (biological replicates). All animal experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA/UFMG), under protocol number 217/2017.

2.3. Real-time RT-PCR

RNA was isolated and amplified using a RNeasy Mini Kit and one-step Quantinova Probe RT-PCR kit, respectively, following the manufacturer's instructions (QIAGEN, Germany). The following primer pair and probe were used: Forward: CCGCTGCCCAACACAAG. Reverse: CCACTA ACCTTCTTTGCGAGACAT. Probe: AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACA CTCA. Real Time RT-qPCR was performed in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) with the following steps: 45 °C for 5 min; 95 °C for 5 min; 40 cycles of 95 °C for 5 s, followed by 60 °C for 30 s. For generation of a semi-quantitative standard curve, RT-qPCR was performed using RNA extracted from a standard viral sample.

2.4. Elisa assays

The concentrations of the cytokines in maternal plasma, spleen, placenta, and foetal brain were measured by using the following commercially available mouse antibodies from DuoSet enzyme-linked immunosorbent kits (R&D Systems, Minneapolis, MN): CCL2/JE/MCP-1 (1:10; catalogue no. DY479), CCL3/MIP-1α (1:10; catalogue no. DY450), CCL4/MIP-1β (1:10; catalogue no. DY451), CCL5/RANTES (1:10; catalogue no. DY478), CXCL9/MIG (1:10; catalogue no. DY492), CXCL10/IP-10/CRG-2 (1:10; catalogue no. DY466), TNF-α (1:2; catalogue no. DY410), IFN-γ (1:10; catalogue no. DY1026), TGF-β (1:10; catalogue no. DY1679), IL-1β/IL-1F2 (1:2; catalogue no. DY401), IL-10 (1:10; catalogue no. DY417), IL-6 (1:10; catalogue n. DY406), and IL-17 (1:10; catalogue no. DY421).

2.5. Offspring neurodevelopment analysis

During offspring development, several behavioural analyses were performed on the same mice, with a one week intervals between each test. All parameters of behavioural tests were analysed by using Any-maze® software.

2.5.1. Sociability test

The sociability test was performed in accordance with Radyushkin et al. [11] An unknown juvenile mouse in the right or left social chamber was alternated between trials, in order to analyse possible effects of lateral preference. Tests were recorded by a video camera and the time spent in each chamber was analysed.

2.5.2. Y-maze

This test was used to evaluate the working memory of offspring. The test apparatus consisted of a Y-shaped maze with three identical arms. Entries and alternance between each arm were recorded by video camera. The test and analyses were performed, as previously described [12].

2.5.3. Elevated plus maze

This test was performed in accordance with Funchal and Dani [13]. Each mouse was recorded by video camera and the instinct of explore open and closed arms, meaning avoid or allow risk was observed. The amount of time and transitions between open and closed arms were analysed.

2.5.4. Open field test

Basal locomotion was evaluated by measuring the distance travelled by a mouse, and initial screening of anxiety-like behaviour was evaluated by the number of entries and amount of time in the center of the apparatus, as previously described [14].

2.5.5. Sucrose preference test

This test was performed to observe the behaviour of rodents, which prefer to ingest a sweet solution instead of water when given a choice between the two (sucrose preference score) [14,15]. A reduction in this preference is characterized by anhedonia, a depression-like behaviour.

2.5.6. Magnetic Resonance Imaging (MRI) analysis

A volumetric brain study was performed by MRI for female offspring after four, eight, and 12 weeks post-birth and for male mice at 12 weeks post-birth. MRI experiments were performed by using a 4.7 T NMR system (Oxford Systems, UK) that is controlled by a UNITY Inova200 imaging console (Varian, USA). The imaging protocol consisted of coronal T2-weighted (TR = 3000 ms, TE = 50 ms) spin echo multislice scans, with 20 contiguous 1 mm thick slices. Mice were anesthetized during the whole imaging procedure with halothane (4% induction, 1.5% maintenance doses) and oxygen (1.5 L/min) via a facial mask. All brain morphometric measurements were performed using the NIH ImageJ program. The total brain volume (mm³) (7 sequential slices from +2.8 to -3.2 cm referenced from Bregma) was calculated by summing-up the area of each section (mm²) multiplied by the slice thickness (1 mm).

2.5.7. Brain sections and staining

Mice (12 weeks) were euthanized and brains were then collected for several staining analyses. Brain samples were processed for routine haematoxylin and eosin (H&E) staining and evaluated histopathologically according to previously described criteria [16]. A researcher performed the histopathological score of cerebral cortex and meningeal inflammation in a blinded manner. Cerebral cortex was graded as follows: 0, no damage; 1, minimal tissue destruction and/or mild inflammation/gliosis; 2, mild tissue destruction and/or moderate inflammation/gliosis; 3, definite tissue destruction (neuronal loss and parenchymal damage) and intense inflammation; 4, necrosis. Meningeal inflammation was graded from 0 to 4; 0, no inflammation, and 1 to 4 corresponding to 1 to 4 cell layers, respectively. The sum of cerebral cortex and meningeal scores comprised the final score, up to 8 points.

For immunostaining analyses, brain samples were processed and sliced as previously described [17]. Slices of cortex were stained for microglia (Iba-1 staining), neurons (NeuN staining), and astrocytes

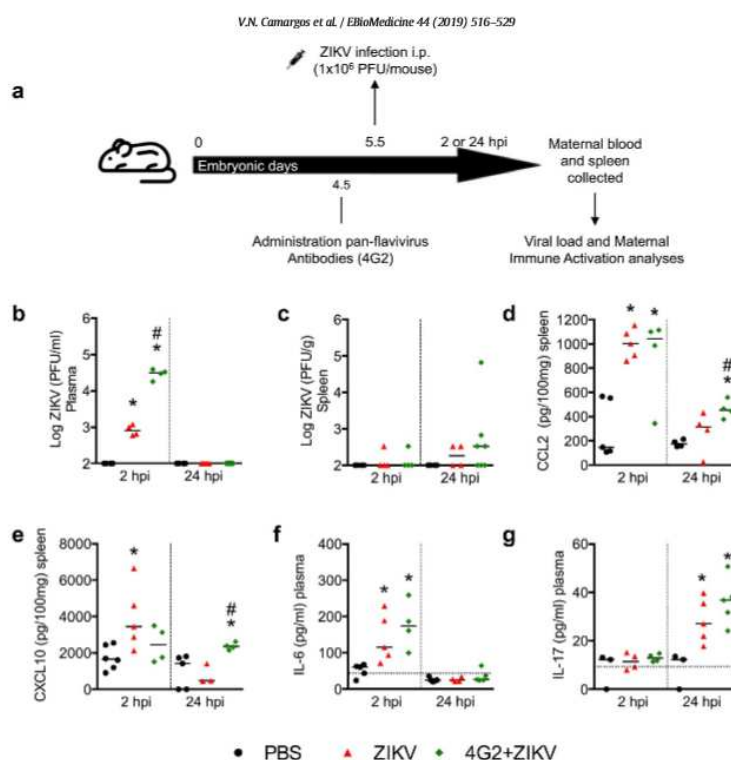


Fig. 1. ZIKV infection leads to maternal immune activation (MIA). Schematic representation of experimental strategy to evaluate maternal immune activation in mice (a). C57BL/6 pregnant mice were injected with PBS (black circles) or 10^6 PFU/mouse of Brazilian ZIKV strain (IS-2015-BA-01) on embryonic day 5.5 in the absence (red triangles) or presence (green lozenges) of anti-envelope monoclonal pan-flavivirus antibody (4G2). Spleen and plasma ($n = 4-6$) were collected 2 (left side of graphs) and 24 (right side of graphs) hours post infection (hpi) to determine the viral burden and inflammatory mediator levels by plaque formation assay and ELISA, respectively. Viral titers are shown as PFU per ml of plasma (b) or PFU per gram of splenic tissue (c). Concentrations of CCL2 (d) and CXCL10 (e) are expressed as picograms per 100 mg of splenic tissue and IL-6 (f) and IL-17 (g) as picograms per ml of plasma. All results are expressed as median and are representative of at least two independent experiments. *, $p < .05$ vs. PBS controls, #, $p < .05$ vs. ZIKV group, as assessed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test (b) or one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-test (d-g). Dashed lines in f and g are cytokine basal concentrations measured from plasma samples collected from the same animal 24 h prior to infection.

(S100 β staining) following procedures supplied by the manufacturer (Vector Elite kit, Vector Laboratories, USA). Neurodegeneration was assessed by Fluoro-Jade C staining as described by Schmued et al. [18]

2.6. Offspring ophthalmological analysis

2.6.1. Intraocular pressure measurement (IOP)

Between the 4th and 12th weeks post-birth, IOP measurements from offspring were performed weekly using an applanation tonometer Tono-Pen Vet (Reichert Technologies, USA) as previously described [19].

2.6.2. Histological analysis

The eyes were enucleated and histological sections were prepared according to Foureaux et al.¹⁹ Retinal ganglion cells (RGC) counting were done by manually counting the whole extension of the retina. Caspase-3 expression in RGC was analysed by immunohistochemistry.

2.7. Offspring testicular analysis

2.7.1. Tissue preparation

After orchietomy, testes were separated from epididymis, weighed, and cut longitudinally with a razor blade into small fragments. Testes were fixed for 24 h by immersion in Bouin's solution, embedded in glycol methacrylate (GMA - Leica historesin embedding kit) and in paraplast (Histosec® - Merck, USA) for histological, stereological, and immunostaining analyses.

2.7.2. Testis parenchyma and seminiferous tubule morphometrical analysis

Volume densities (%) of testicular tissue components were estimated by counting 6615 points over testis parenchyma [20]. Seminiferous tubule diameter and tubular lumen were measured, as described by Johnson and Neaves [21]. Seminiferous tubule morphology was classified according to its epithelium features, as follows: 1) presenting all germ cell types without apoptosis; 2) showing germ cell apoptosis/

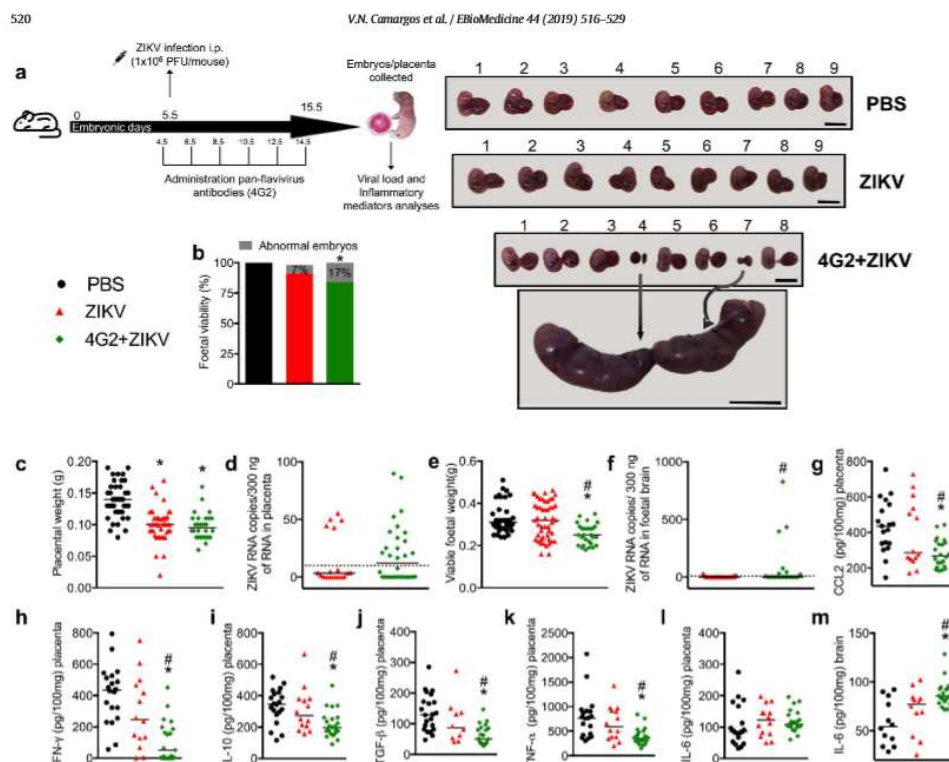


Fig. 2. Foetal viability, viral burden and inflammatory mediator alterations associated with ZIKV infection. Schematic representation of experimental strategy to evaluate the consequences of antibody-dependent enhancement on maternal ZIKV infection at the embryonic level (a). C57Bl/6 pregnant mice were injected with PBS (black bar or circles) or 10⁶ PFU/mouse of Brazilian ZIKV strain (HS-2015-BA-01) on embryonic day 5.5 in the absence (red bar or triangles) or presence (green bar or lozenges) of monoclonal pan-flavivirus antibody (4G2). After harvesting on ED 15.5 (n = 4–6; all foetuses and respective tissues from four–six pregnant dams), foetal malformations were registered (b) and viable foetuses (c) and placentas (c) were weighed. Representative pictures of litters from each group are shown on the right side of panel b, where two malformations are highlighted by arrows in a 4G2 + ZIKV animal-derived uterine horn. Scale bar represents 1 cm in all images. ZIKV RNA was quantified by qRT-PCR in placenta (d) and foetal brain (f). Inflammatory mediator concentrations were determined by ELISA in placenta (g–l) and foetal brain (m) and expressed as picograms per 100 mg of tissue. qRT-PCR results are expressed as the median of ZIKV RNA copies per 300 ng of sample RNA. ELISA results are expressed as median and are representative of at least two independent experiments. *, p < 0.05 vs. PBS controls, #, p < 0.05 vs. ZIKV group, as assessed by Fisher's exact test (b), Mann-Whitney test (f), or one-way ANOVA followed by Tukey (c and e) or Newman-Keuls post-test (g–m).

degeneration; 3) absence of germ cell layers; and 4) presenting retention of residual bodies. Thirty tubule cross-sections, randomly chosen, were evaluated per animal in these analyses.

2.7.3. Cell quantification

2.7.3.1. Germ cells. Cells present in stage VII of the seminiferous epithelium cycle were counted in ten seminiferous tubule cross-sections per mouse. Cell ratios/proportions were achieved from corrected counts according to Abercrombie [22] as modified by Amann [23].

2.7.3.2. Leydig cells. Leydig cell volume was obtained as described by Costa et al.²⁰ In addition, the Leydig cell number was estimated from the individual size and the total volume occupied by these cells in testis parenchyma.

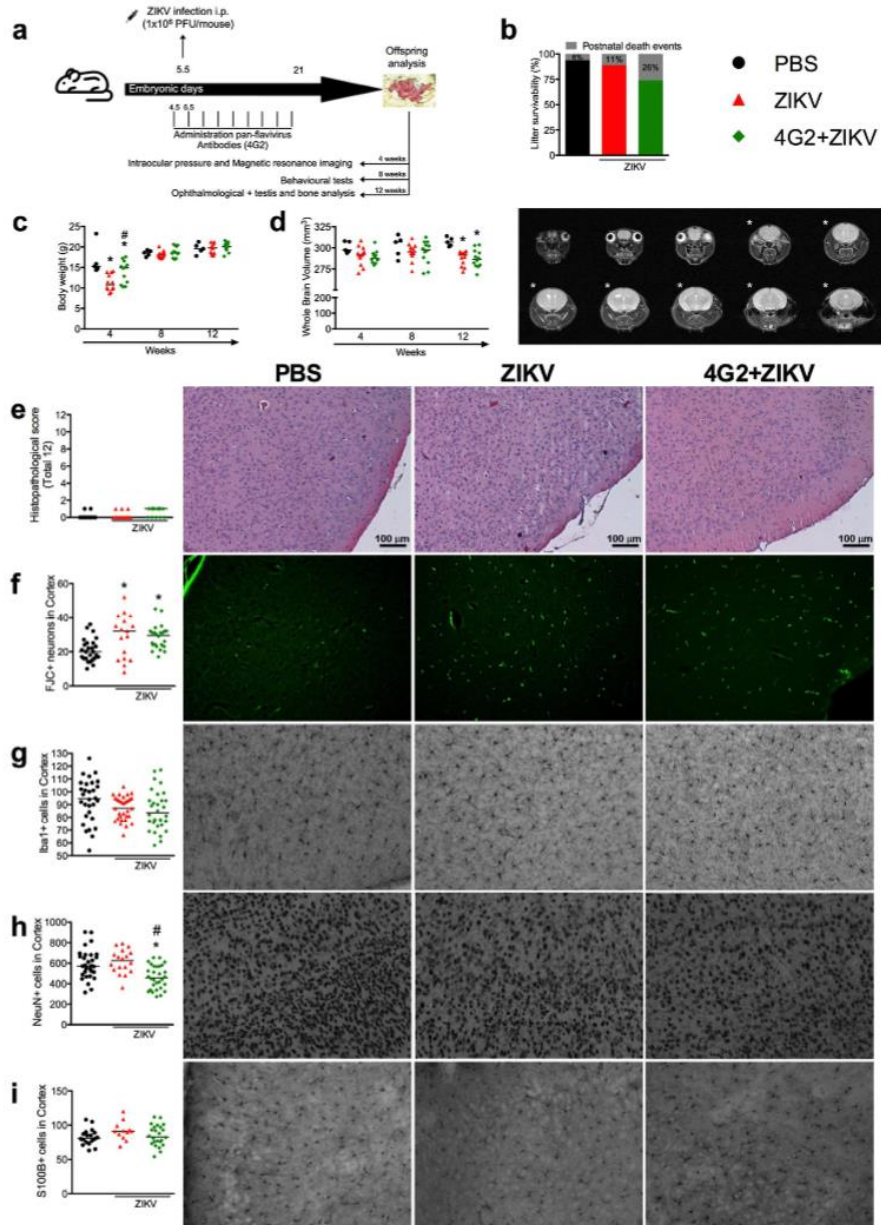
2.7.4. Immunostaining analysis

Following standardized protocols [24], testicular serial sections (5 μ m thick) were immunostained for Caspase-3. Reactions were visualized using biotin-conjugated secondary antibody in combination with Elite ABC Kit (Vector Laboratories, CA). In order to quantify the germ cell apoptotic index, fifteen seminiferous tubule cross-sections, randomly chosen, were evaluated for each animal. Data were expressed dividing the apoptotic germ cells number per seminiferous epithelium area. Analyses were conducted using Image J v.1.45 s software (Image Processing and Analysis, in Java).

2.8. Offspring bone analysis

2.8.1. Cell culture

Bone marrow cells (BMC) were obtained from the femurs of mice from PBS mock-infected and ZIKV-infected groups. Cells were



differentiated into osteoclasts and osteoblasts and analysed, as previously described [25].

2.8.2. Micro-computed tomography (micro CT) analysis

Trabecular microarchitecture and bone density within the metaphyseal region of distal femurs were quantified using micro CT according to Macari et al.²⁵

2.8.3. Histomorphometry

Measurements were performed at the distal femur excluding the growth plate where the distal metaphysis was performed, as previously described [25] according to international standards. H&E staining was used for measuring the density of osteocytes per trabecular bone area, tartrate resistant acid phosphatase (TRAP; Sigma-Aldrich, USA) for osteoclasts TRAP positive analysis and Masson's Thricrome staining used for osteoblasts per trabecular bone perimeter.

2.8.4. mRNA extraction and qPCR

For quantitative PCR (qPCR) analysis, we extracted the mRNA from femur specimens with Trizol and column purification (RNeasy Mini Kit, Qiagen Inc., USA). We prepared complementary DNA with Superscript Vilo Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) and performed qPCR analysis on a Light Cycler 480 (Roche Applied Science) with the following target genes: RANK (*Tnfrsf11a*), RANKL (*Tnfrsf11*), osteoprotegerin (OPG, *Tnfrsf11b*), RANKL/OPG ratio, TNF- α (*Tnf*), and interleukin-6 (*il6*). For calculation of the relative gene expression, we normalized data to the gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and quantified the results using the cycle threshold (Ct) method and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculation [25].

2.9. Statistical analyses

Data were tested for normality and homoscedasticity of the variances. Quantitative data were presented as median values, except for IOP measurements, which were displayed as the mean \pm SEM (standard error of the mean). Analyses were conducted using the PRISM v7.0 software program (GraphPad Software, Inc). Data were analysed using different-tests as appropriate. An unpaired parametric t-test for comparison between two groups, or a one- or two-way ANOVA for comparisons between three groups was used, followed by the Newman-Keuls test in the case of data with a normal distribution, or the Kruskal-Wallis followed by Dunn's test in the case of nonparametric data. Fisher's exact test was used to compare categorical variables. Differences were considered statistically significant at $p < .05$.

3. Results

3.1. Zika virus infection induces maternal immune activation

Recently, Rathore et al. [26] demonstrated the enhancement capacity of subneutralizing doses of either immune DENV serum or 4G2 antibody, during ZIKV infection in immunocompetent dams. In the present work we performed similar experiments by using subneutralizing doses of the 4G2 pan-flavivirus antibody and aimed to evaluate the short- and long-term consequences of the antibody-dependent enhancement

phenomenon on ZIKV-infected offspring. In this study, a subneutralizing dose of 4G2 antibody refers to a dose that is sufficient to allow virus-complex formation but not to neutralize the virus. First, the neutralizing capacity of 4G2 antibody against ZIKV was evaluated in vitro using the human monocyte cell line - THP-1 ATCC® TIB-202™ (data not shown). Next, to evaluate the ability of ZIKV to induce Maternal Immune Activation (MIA), pregnant C57BL/6 mice were infected with ZIKV on embryonic day (ED) 5.5 and samples were collected at 2- or 24-h post-infection (hpi) for measurement of viral loads and systemic inflammatory mediators. In parallel, to emulate a secondary infection in vivo, pregnant mice were injected with a sub-neutralizing dose of 4G2 24 h before ZIKV infection (Fig. 1A). Throughout the experiments, the negative control group received PBS solution (PBS group) and the positive control group received an isotype control antibody (IgG2a) with no specificity against ZIKV (ZIKV group). 10^3 viable particles were recovered from the plasma of isotype-treated, ZIKV-infected dams 2 hpi and 10^5 viable particles from 4G2-treated dams at the same time point (Fig. 1B). At 24 hpi, no viable virus was detected in any group. In spleen, viral loads were similar between ZIKV and 4G2-ZIKV dams at both time points (Fig. 1C).

In the ZIKV-infected group, we also detected increased levels of CCL2 and CXCL10 in spleen only 2 hpi while, in the 4G2 + ZIKV group, a higher concentration of CCL2 occurred at both time points and there was a delay in CXCL10 production with an increase observed at 24 hpi (Fig. 1D-E). The increase in the levels of IL-6 and IL-17 presented the same profile in both groups: an increase in IL-6 at 2 hpi and increase in IL-17 at 24 hpi in the plasma of infected mice (Fig. 1F-G). Of note, there were no changes in the levels of other cytokines evaluated in spleen (Fig. S1A–I) and plasma (Fig. S2) in both infected-groups, as compared to PBS-injected controls at both time points.

3.2. Congenital Zika virus infection causes placental and foetal damage, which are aggravated by pre-treatment with 4G2 antibody

To investigate the consequences of ADE on ZIKV infection at the embryonic level, the experimental design was performed as presented in Fig. 2A. Briefly, pregnant dams received subneutralizing doses of 4G2 antibody ($10 \mu\text{g}$) 24 h before ZIKV inoculation and every 48 h after the first antibody injection until ED 14.5 as described in [9]. To ensure that consecutive intraperitoneal injections would not induce any additional distress to the mother or offspring, the same experimental protocol, including contention methods and antibody inoculation, was applied for both negative control and ZIKV-infected groups, which received PBS and IgG2a antibody, respectively. Based on this format, our results demonstrate that ZIKV infection resulted in a reduction of about 7% in foetal viability (Fig. 2B) when compared to PBS controls. Foetal demise was about 17% in the 4G2 + ZIKV group during the same period (Fig. 2B). The placental weight was decreased in both infected-groups in comparison to the PBS group (Fig. 2C). In addition, detection of ZIKV RNA was similar between the ZIKV and 4G2 + ZIKV groups in the placenta (Fig. 2D). A more pronounced decrease in whole foetal body weight from viable embryos was observed in the 4G2 + ZIKV group when compared to the offspring of PBS-injected and ZIKV-infected dams (Fig. 2E). Accordingly, a higher number of ZIKV-RNA positive samples were detected in foetal brains in the 4G2 + ZIKV group in comparison to the

Fig. 3. Administration of 4G2 contributes to the exacerbation of persistent neuropathological outcomes in offspring born from ZIKV-infected dams. Schematic representation of experimental strategy to evaluate the long-term consequences of ZIKV infection during pregnancy and exacerbation of potential abnormalities related to CZS by antibody-dependent enhancement of ZIKV infection (a). C57BL/6 pregnant mice were injected with PBS (black bar or circles) or 10^9 PFU/mouse of Brazilian ZIKV strain (HS-2015-BA-01) on embryonic day 5.5 in the absence (red bar or triangles) or presence (green bar or lozenges) of monoclonal pan-flavivirus antibody (4G2). Pregnant dams were accommodated in separate cages until natural litter were born. Then, partial or total postnatal litter deaths were registered (b). Female offspring ($n = 6$; one or two mice from six different dams) were weighed (c) and brain volume was quantified by magnetic resonance imaging (d). Left panel in (d) represents sequential brain images and asterisks indicate which slices were used to determine the brain volume. Animals were euthanized, their brains collected and stained by haematoxylin and eosin (e), Fluoro-Jade C (f; neurodegeneration), or immunohistochemistry using anti-Iba1 (g; microgliosis), anti-NeuN (h; neuron counting), or anti-S100B (i; astrocyte counting) antibodies. Two brain slices of five different mice (from five different dams) per group were used. Three representative images of each section (right side of graphs) were quantified using ImageJ software and results are expressed as the median of all cell counts per group (e-i). Magnification, $200\times$. Scale bar, $100 \mu\text{m}$. *, $p < .05$ vs. PBS controls. #, $p < .05$ vs. ZIKV group, as assessed by two-way ANOVA followed by Tukey post-test (c-d) or one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-test (f and h).

mice that were only infected with ZIKV (Fig. 2F). However, no detectable viral particles were recovered from any group.

There were similar levels of the inflammatory mediators CCL2, IFN- γ , IL-10, TGF- β , TNF- α , and IL-6 (Fig. 2G–L) in the placenta of non-infected and ZIKV-infected dams. Of note, no alterations on baseline cytokine levels of mice that received IgG2a or 4G2 antibodies in comparison to PBS-injected controls were observed (data not shown). Interestingly, the levels of all inflammatory mediators were lower in the placenta of the 4G2 + ZIKV group when compared to PBS and ZIKV groups (Fig. 2G–K), with the exception of IL-6 (Fig. 2L). There were no changes in the concentrations of CCL5, IL-1 β , IFN- α , or IFN- β in the placenta (Fig. S3A–D). Of note, IL-6 levels were elevated in the foetal brain of 4G2 + ZIKV, but not in the ZIKV group (Fig. 2M). While CCL2, IL-10, IFN- γ , and TGF- β levels were reduced in the brains of the ZIKV group (Fig. S3I–L), only the latter two cytokines were also downregulated in the brain of 4G2 + ZIKV foetuses (Fig. S3K–L). No alterations in CCL5, IL-1 β , IFN- α , IFN- β , or TNF- α levels were found in the brains of offspring (Fig. S3E–H, M). Overall, the administration of a subneutralizing dose of 4G2 to pregnant dams resulted in a greater frequency of viral infections and enhanced foetal demise, and these responses were associated with inflammatory hyporesponsiveness in the placenta as well.

3.3. Congenital Zika virus infection results in neuropathological abnormalities in the offspring of ZIKV-infected dams

Next, to investigate the long-term consequences of ZIKV infection during pregnancy and whether treatment with 4G2 could also exacerbate potential abnormalities related to CZS from birth to adulthood, the natural birth of the pups was facilitated as demonstrated in Fig. 3A. Pregnant dams were monitored daily after ZIKV infection by means of weight measurements and appearance of clinical signs. The results revealed no change in weight gain (Fig. S4A) or appearance of clinical symptoms until litter birth, in all evaluated groups. However, a reduction in offspring survival was observed in the ZIKV group (about 11%) and the 4G2 + ZIKV group (26%), compared to the PBS group (6%) (Fig. 3B).

Whole brain volume, which is an indicator of brain development, was measured by magnetic resonance imaging (MRI) from the 4th to the 12th week of life (Fig. 3D). The results revealed a reduction in overall body weight at the 4th week of life for female offspring of ZIKV-infected dams (Fig. 3C), although the brain volume at this time point was similar among the tested groups (Fig. 3D). Thereafter, at the 8th and 12th weeks of life, the body weight of female offspring from ZIKV-infected dams became similar to those born from dams in the PBS control group (Fig. 3C). However, there were significant changes in brain volume in both infected groups at the 12th week after birth, as compared to PBS controls. Similar results were found in the group of male mice who has been subjected to MRI analysis at the 12th week after birth (Fig. S4B–C).

Histopathological analyses of brain slices from 12-week-old offspring showed no gross changes in the brains of ZIKV and 4G2 + ZIKV groups in comparison to PBS controls (Fig. 3E). Notably, there was increased neurodegeneration, as assessed by Fluoro-Jade C staining, in samples from the offspring of ZIKV-infected and 4G2 + ZIKV dams (Fig. 3F). However, there were no changes in the number of IBA1⁺ (Fig. 3G) and S100B⁺ (Fig. 3I) cells in the control or infected mice. The number of NeuN⁺ neurons was reduced in the cortex of 4G2 + ZIKV offspring in comparison to PBS and ZIKV littermates (Fig. 3H).

Next, we performed a series of cognitive and behavioural tests on male offspring between the 8th and 12th weeks of life (Table S1). Cognitive tests evaluating sociability (sociability test), anxiety (elevated plus maze and open field tests), and working memory (Y-maze test) presented similar results in all groups of mice. Further analysis also revealed the absence of changes in motor locomotion (open field test) and depression (sucrose preference test) in all groups.

3.4. Congenital Zika virus infection results in ophthalmological abnormalities in the offspring of ZIKV-infected dams

Our results showed a slight increase in the IOP values of the ZIKV-infected group in comparison to the control group (Fig. 4A). Strikingly, mice from the 4G2 + ZIKV group displayed even higher IOP levels at all evaluated time points. Next, we collected the eyes at week 12 to examine the number of Retinal Ganglion Cells (RGC) (Fig. 4B). Even though RGC counts from the animals in the PBS and ZIKV-infected groups showed similar cell numbers, there was a significant reduction in the RGC counts in the 4G2 + ZIKV group when compared to the PBS control. The reduction in RGC counts was associated with an increase in the number of cells that stained positive for caspase-3 (Fig. 4C).

3.5. Congenital Zika virus infection results in testicular abnormalities in the offspring of ZIKV-infected dams

Important histological testicular parameters were evaluated in control (Fig. 5A), ZIKV (Fig. 5B), and 4G2 + ZIKV (Fig. 5C) groups. There were no detectable changes in macroscopy or weight of the testes of offspring from infected or non-infected dams (Fig. 5D). However, there was a significant reduction in the density of testicular components, including reduction in seminiferous tubule volume, tubular diameter, and tubular lumen (Fig. 5E–G) in the infected groups when compared to the control and ZIKV-infected groups. Indeed, ZIKV and 4G2 + ZIKV groups presented important morphological alterations in seminiferous tubules when compared to non-infected littermates (Fig. 5B1, C1, H). About 40% of the seminiferous tubules showed some altered features, as shown by seminiferous epithelium degeneration, absence of some germ cell types, and retention of residual bodies (Fig. B2, C2, I). Indeed, Sertoli cell efficiency, estimated by the number of round spermatids per Sertoli cell, was reduced in the 4G2 + ZIKV group (Fig. 5J). The meiotic index, measured as the number of round spermatids produced per pachytene primary spermatocyte (Fig. 5K), was also reduced in the both infected groups when compared to the control group. Accordingly, a higher frequency of Caspase-3-positive cells per area of seminiferous epithelium was found in the ZIKV-infected group, although it was not different in the 4G2 + ZIKV group (Fig. 5L–O). Intertubular testis analysis revealed no significant alterations with respect to blood vessels (Fig. S5I) and Leydig cells (Fig. S5A–H).

3.6. Congenital Zika virus infection affects bone quality in the offspring of ZIKV-infected dams

Femurs from adult offspring born from PBS, ZIKV, and 4G2 + ZIKV-infected dams were collected and analysed by micro-computed tomography (Micro CT) analysis. Our results show that ZIKV infection induced marked bone loss in the femur of adult litters, as shown by a significant decrease in various bone parameters, including bone mineral density (BMD), percentage of trabecular bone volume/total volume (BV/TV%), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N) and increase in the structure model index (SMI) (Fig. 6). These changes were comparable in the ZIKV and ZIKV+4G2 groups. Moreover, there was no difference in trabecular separation (Tb.Sp) in the bones of adult offspring from infected or non-infected mice (Fig. 6F).

Fig. 6K shows representative photomicrography from osteoclasts (top panel), osteoblasts, and osteocytes (bottom panel) in the offspring of control and infected mice at 12 weeks of age. Osteoclasts were identified as TRAP-positive, osteoblasts were recognized in sections by their size, shape, and position in bone (black arrows, bottom panel), and osteocytes were surrounded by bone in the trabecular bone of the femur (red square, bottom panel). In agreement with the Micro CT analysis, there was an increase in number of osteoclasts (Fig. 6H) and osteocytes (Fig. 6I) in both infected groups. The number of osteoblasts was only increased in the 4G2 + ZIKV group (Fig. 6J). There was a similar

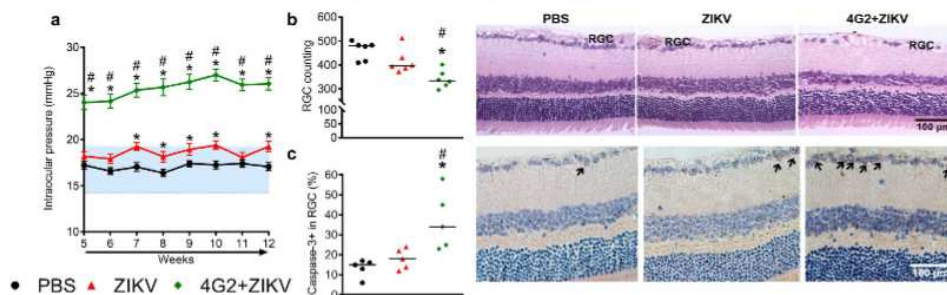


Fig. 4. Ophthalmological abnormalities of offspring associated with ZIKV infection. C57Bl/6 pregnant mice were injected with PBS (black circles) or 10^6 PFU/mouse of Brazilian ZIKV strain (HS-2015-BA-01) on embryonic day 5.5 in the absence (red triangles) or presence (green lozenges) of monoclonal pan-flavivirus antibody (4G2). Offspring born from injected dams were analysed. Intraocular pressure was measured weekly for offspring from the 4th to 12th week of age (a), where the highlighted area in blue indicates normal values of IOP in C57Bl/6 mice. After euthanasia, eyes ($n = 5-6$; one mouse from five or six different dams) were enucleated for Retinal Ganglion Cell counting (b) and caspase-3 immunohistochemistry analysis (c). In representative images of retinas, RGC layer are specified in (b) and caspase-3 positive cells are indicated by arrows in (c). Magnification, 400 \times . Scale bar = 100 μ m. IOP results are expressed as mean \pm SEM and cell counts are shown as median. *, $p < .05$ vs. PBS controls, #, $p < .05$ vs. ZIKV group, as assessed by two-way (a) or one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-test (b-c).

increase in RANKL/OPG ratio and IL-6 mRNA expression (Fig. 6L and M) in the femur of offspring born from both groups. There were no significant differences in RANK or TNF- α (Fig. 6N-O) mRNA expression in all groups.

In vitro experiments conducted with BMCs from the femurs of PBS and ZIKV-infected mice revealed a decrease in osteoclast viability and enhanced osteoclast differentiation as determined by an increase in MTT- and TRAP-positive cell numbers, respectively, in the ZIKV-infected group when compared to the PBS control (Fig. S6A–C). Enhanced osteoblast activity, as assessed by an increase in alizarin red absorbance, was also detected in BMCs obtained from ZIKV-infected animals in comparison to PBS controls (Fig. S6D–E).

3.7. Therapeutic administration of an antiviral peptide (AH-D) decreases the frequency of viral infection and reduces foetal death

In order to explore whether the AH-D peptide could prevent viral replication and foetal death, the peptide was therapeutically administered daily starting three days after infection of dams (Fig. 7A). As mice subjected to 4G2 treatment had more severe disease in some parameters, this model was chosen for evaluating the therapeutic treatment as shown in Fig. 7A. Fig. 7B shows that, while seven of 54 pups (13%) from vehicle-treated dams presented ZIKV RNA copies that were recovered from the brain, therapeutic administration of AH-D peptide prevented ZIKV RNA detection in all of the 36 pups (Fig. 7B). Accordingly, the frequency of foetal demise dropped from 21% in vehicle-treated to 10% in AH-D peptide-treated dams (Fig. 7C). However, viral replication inhibition by AH-D peptide therapy was insufficient by itself to prevent the reduction of placental and whole foetal weight induced by ZIKV infection (Fig. 7D–E).

4. Discussion

The major findings of this study were: i) congenital ZIKV infection of immunocompetent adult pregnant mice causes transient systemic inflammation (MIA), placental infection, and foetal demise; ii) administration of a subneutralizing dose of a pan-flavivirus antibody before infection appears to enhance congenital ZIKV infection, as seen by prolonged MIA, enhanced frequency of brain infection, and foetal demise, along with causing placental inflammatory hyporesponsiveness; iii) congenital ZIKV infection caused major changes in the brain, eyes, testes, and bones of the adult offspring; iv) changes in the testes and bone of offspring of infected dams were not aggravated by previous

administration of 4G2 antibody whereas changes in brain and eye became more pronounced; v) treatment with an antiviral peptide decreased the frequency of brain infection and foetal demise in a mouse model of CZI.

Epidemiological evidence implicates that the activation of the maternal immune system during pregnancy can be triggered by several types of stimuli, including infectious agents such as TORCH pathogens, leading to the development of neuropsychiatric disorders in adulthood [4]. Here, we demonstrated that congenital ZIKV infection resulted in MIA as demonstrated by elevated levels of proinflammatory mediators, such as CCL2, CXCL-10, IL-6, and IL-17, in infected dams. Interestingly, in the presence of 4G2, there was a prolonged detection of chemokines and increased viral load in maternal plasma, suggesting that ADE could contribute to the exacerbation of MIA during congenital ZIKV infection. Accordingly, production of IL-17 driven by IL-6 plays a key role in MIA as demonstrated in previous studies [27–29]. Indeed, a single injection of IL-6 to pregnant mice has been shown to be sufficient to induce MIA and resulted in behavioural alterations in offspring, which were prevented by an IL-6 blockade in vivo. [30]

In accordance with recently work published by Rathore et al. [26], we did not detect increased ZIKV RNA copies in the placenta of the 4G2 + ZIKV group compared to isotype-matched controls, however, higher viral loads in the foetal brain of the 4G2 + ZIKV group was observed. Analysis of inflammatory mediators in placentas revealed a general placental hyporesponsiveness profile that was characterized by reduced levels of cytokines in the 4G2 + ZIKV group. By contrast, elevated levels of IL-6 in the brain of the offspring born from those dams were found and were associated with a higher frequency of offspring malformations, providing evidence of the role played by ADE in the enhancement of ZIKV infection and suggesting that there is induction of neuroinflammation on the offspring. Accordingly, several in vitro and experimental studies in rodents have supported the occurrence of the ADE phenomenon during ZIKV infection [26,31–36]. However, others have indicated a lack of cross-reaction or even protection from ZIKV infection after DENV infection in experimental models and clinical-epidemiological findings [37–42]. Indeed, in the context of MIA, there is evidence that elevated levels of pro-inflammatory cytokines negatively impact the development cortical neuron dendrites, causing a neuropathy similar to schizophrenia [43]. Taken together, our results support the idea that ADE contributes to the enhancement of ZIKV infection and MIA, which could eventually lead to the abnormal pathology associated with CZS.

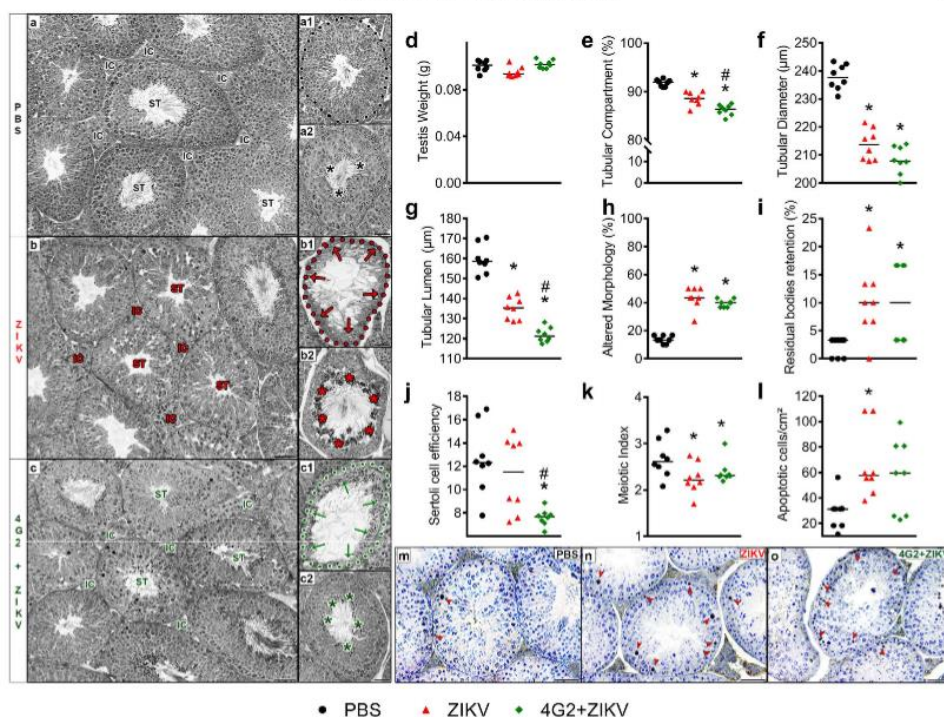


Fig. 5. Changes in the testis tubular compartment of offspring associated with ZIKV infection. C57BL/6 pregnant mice were injected with PBS (black circles) or 10^6 PFU/mouse of Brazilian ZIKV strain (HS-2015-BA-01) on embryonic day 5.5 in the absence (red triangles) or presence (green lozenges) of monoclonal pan-flavivirus antibody (4G2). Offspring born from injected dams were analysed. After euthanasia at 12 weeks-of-age followed by orchidectomy ($n = 5$; at least one random animal from five different dams in each group), testis were weighed (d) prior to morphometrical analyses, which included the proportion of tubular compartments (e), tubular diameter (f), and tubular lumen (g), morphological alterations (h), such as seminiferous epithelium degeneration (arrows in b1 and c1), absence of germ cell types (b1, c1), and increased retention of residual bodies (asterisks in b2 and c2; i), Sertoli cell efficiency (j), meiotic index (k), and prevalence of caspase-3 positive cells (l); red arrowheads in (m-o) per area of seminiferous epithelium. Images: IC = interstitial compartment; seminiferous tubules (ST); cross-sections (dotted line). Magnification = 200 \times . Scale bar (black lines) = 50 μ m. Results are expressed as median values. *, $p < .05$ vs. PBS controls, #, $p < .05$ vs. ZIKV group, as assessed by one-way ANOVA followed by Tukey post-test (e-l).

While the short-term impact of congenital ZIKV infection has been investigated in some detail [1,44–48], only a few studies have started to investigate the long-term consequences of CZS in offspring. In this context, Satterfield-Nash and colleagues [49] followed-up on the health and development of nineteen children with a confirmed microcephaly diagnosis at birth until 19–24 months of age. The results revealed that most of these children presented severe motor impairment, seizure disorders, hearing and vision abnormalities, and sleep difficulties. Accordingly, using Swiss mice inoculated with ZIKV three days after natural birth, the authors showed the occurrence of postnatal microcephaly and behavioural changes during adulthood, as evidenced by increased seizure episodes along with motor and cognitive dysfunctions in adult offspring [50]. In this study, we demonstrated that congenital ZIKV infection was associated with a reduction in brain volume, increased neurodegeneration, and reduced neuronal cell counts in adult offspring born from ZIKV and 4G2 + ZIKV infected groups, suggesting an impairment in brain development at adulthood. Our findings agree well with several other experimental analyses conducted in newborn mice in which cortical disorganization after ZIKV infection was also observed

[44,51–53]. However, maternal infection on embryonic day (ED) 5.5 was not able to induce significant behavioural abnormalities in adult offspring. A previous study also demonstrated that maternal ZIKV infection of AG129 mice on ED 7.5 did not result in any motor or cognitive deficits in adulthood [54]. These results lead to an important insight about the “vulnerability window”, during which stage there is a greater likelihood of infection leading to long-term development of neurological-like symptoms and suggesting that, during the initial stage, the placenta plays a more important role due to increased exchange between the mother and foetus.

ZIKV infection has also been shown to be associated with substantial ophthalmological abnormalities both in infants with confirmed microcephaly diagnosis and in children with a normal cephalic perimeter [55,56]. Here, we demonstrated that ADE and its associated MIA could contribute to the exacerbation of ophthalmological abnormalities induced by congenital ZIKV infection. This change was associated with a massive reduction in RGC numbers secondary to apoptosis events, as demonstrated by an increase in Caspase-3 staining. Our results are in accordance with previous studies that showed that direct intrauterine

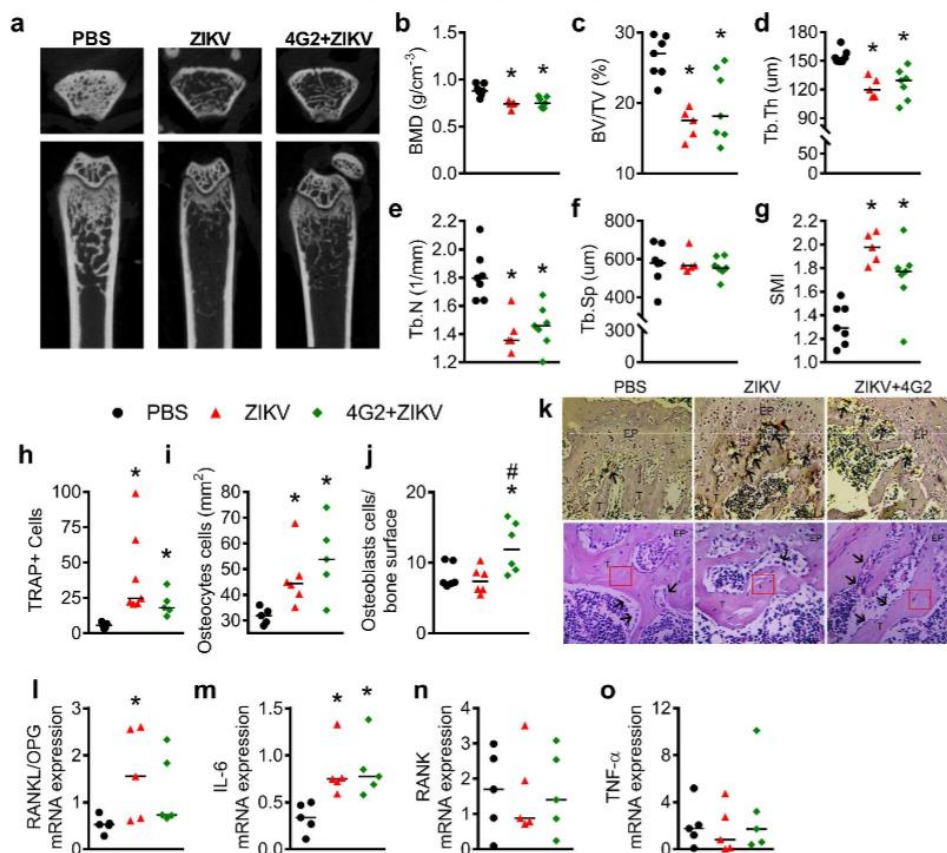


Fig. 6. Bone alterations in offspring associated with ZIKV infection. C57BL/6 pregnant mice were injected with PBS (black bar or circles) or 10⁶ PFU/mouse of Brazilian ZIKV strain (HS-2015-BA-01) on embryonic day 5.5 in the absence (red bar or triangles) or presence (green bar or lozenges) of monoclonal pan-flavivirus antibody (4G2). Offspring born from injected dams were analysed. After euthanasia at 12 weeks-of-age, femurs were collected and analysed by micro-computed tomography (micro CT) and images are shown in (a), and the analysed parameters included: bone mineral density (b; BMD, g/cm³), percent bone volume (c; BV/TV %), trabecular thickness (d; Tb.Th, μm), trabecular number (e; Tb.N, 1/mm), trabecular separation (f; Tb.Sp, μm), and structure model index (g; SMI). Femur bone loss was evaluated by osteoclasts, osteocytes, and osteoblast counting (h–j). Osteoclasts representative photomicrography (k, upper panel; black arrows indicate TRAP-positive osteoclasts, T – trabecular bone, EP – epiphyseal disk). Magnification: 20×. Scale bar = 100 μm. Osteoblast representative photomicrography (k, bottom panel; black arrows demonstrate osteoblasts in contact with trabecular bone, T – trabecular bone, EP – epiphyseal disk; red square – area where osteocytes were counted). Magnification: 40×. Scale bar = 50 μm. mRNA expression of (l) Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand/osteoprotegerin ratio (RANKL/OPG), (m) interleukin-6 (IL-6), (n) Receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK), and (o) tumour necrosis factor (TNF) in the femur of offspring. Results are expressed as the median. *, p < .05 vs. PBS controls, #, p < .05 vs. ZIKV group, as assessed by one-way ANOVA followed by Tukey post-test (b–e, g–j, and l–m).

ZIKV inoculation to immunocompetent C57BL/6 dams or pregnant rhesus macaque presented ocular abnormalities [52,57]. Overall, the findings indicate that congenital ZIKV infection is associated with long-term ophthalmological impairment that may progress to chronic conditions leading to an irreversible impact on visual field loss.

Here, we identified important morphological alterations in the tubular compartment of testis in offspring born from ZIKV-infected dams. Recent studies have shown that ZIKV has tropism to several cell types such as spermatogonia, primary spermatocytes, and Sertoli cells [58–61]. Marked germ cell apoptosis and detachment of Sertoli cells from the basement membrane also leads to damage to the architecture

of seminiferous tubules, resulting in the loss of the central lumen as well as testicular atrophy [62,63]. Similarly, our results showed a reduction in seminiferous tubule size, as well as seminiferous epithelium degeneration or the absence of some germ cell types (particularly primary spermatocytes) in both ZIKV-infected groups. Of note, some of those parameters were exacerbated in the presence of 4G2. Several studies have considered that Sertoli cells are a key target for ZIKV infection in the testes [59,62,64]. Our data suggest that ZIKV maintains its tropism to these somatic cells, once a reduction of Sertoli cell efficiency was observed in our experimental model. Another possible consequence associated with Sertoli cell alterations caused by ZIKV infection was a

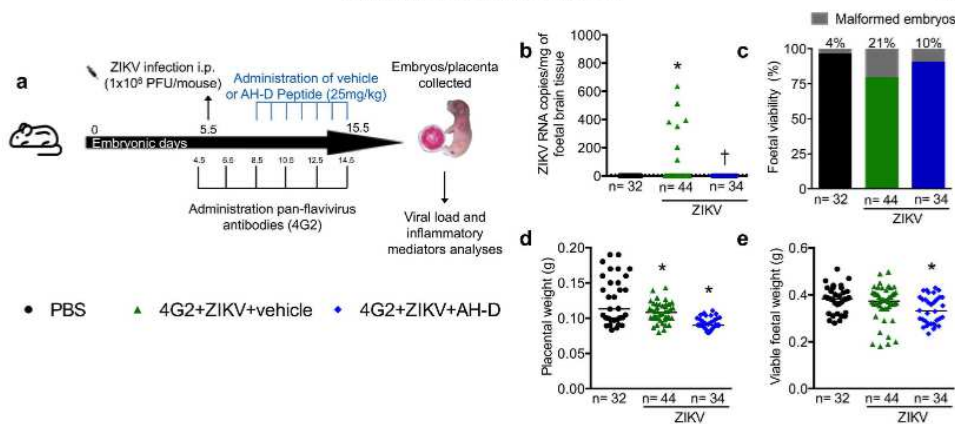


Fig. 7. Therapeutic administration of an antiviral peptide (AH-D) ameliorate CZS outcomes. Schematic representation of experimental strategy to evaluate the antiviral activity of AH-D peptide in ADE of maternal ZIKV infection model (a). C57BL/6 pregnant mice were injected with PBS (black bar or circles) or 10^6 PFU/mouse of Brazilian ZIKV strain (HS-2015-BA-01) on embryonic day 5.5 in the presence (green bar or triangles) of monoclonal pan-flavivirus antibody (4G2). AH-D therapy started at three days post infection (blue bar or lozenges) until ED 15.5, when fetuses and placentas were harvested and weighted (d-e), foetal malformations were registered (c), and ZIKV RNA was quantified by qRT-PCR in foetal brain (b). qRT-PCR results are expressed as the median of ZIKV RNA copies per mg of sample tissue. Weight data are expressed as the median and are representative of at least two independent experiments. *, p < .05 vs. PBS controls, † p < .05 vs. 4G2 + ZIKV, as assessed by Mann-Whitney test (b) and one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-test (d-e).

reduction in the meiotic index, which indicates that Sertoli cells were not fully supporting the development of germ cells. On the other hand, decreased testosterone levels associated with diminished 3 β -HSD + Leydig cells population have been reported in acute ZIKV infection [59,62]. In this study, no substantial morphometric alterations were observed for Leydig cells, suggesting that these steroidogenic cells could not serve as a primary target for ZIKV within the vertically infected testes.

Arthrogryposis is a common feature of congenital ZIKV infection [10,65]. Here, we demonstrated that ZIKV infection augmented generation of osteoclasts and osteoblasts, suggesting an increased bone remodelling profile. The findings also revealed an increase in osteoclasts and osteocytes numbers, without change in the osteoblasts of ZIKV-infected offspring. This result suggests impaired osteoblast differentiation induced by ZIKV, which resulted in increased bone loss. As an underlying mechanism, we found increased expression of IL-6 cytokine and RANKL/OPG ratio in the femur of ZIKV-infected mice. Increased levels of those mediators are directly associated with bone resorption [66]. Accordingly, a study conducted by Bayless and colleagues [67] demonstrated that ZIKV infects cranial neural crest cells, which are the direct progenitors of bone cells and may underlie ZIKV-associated microcephaly.

We have recently engineered a brain-penetrating peptide (AH-D) that exhibits antiviral activity against ZIKV and other mosquito-borne viruses [16,68]. Using the adult A129 model of ZIKV infection, we demonstrated that therapeutic administration of AH-D peptide protected ZIKV-infected mice against mortality and significantly reduced clinical symptoms, viral loads, and neuroinflammation, as well as reduced the levels of microglia, neurodegeneration, and brain damage. Here, we further evaluated the therapeutic efficacy of AH-D peptide during congenital ZIKV infection in an immunocompetent mouse model. Our results revealed that AH-D peptide therapy prevented ZIKV RNA detection in the brain of the offspring and also reduced the number of malformed embryos. Compared to protective strategies [69,70] aimed at post-exposure treatment (one hour to one day post-infection), the AH-D peptide therapy was effective when started at later stages

(three days post-infection) and resulted in complete suppression of detectable viral loads in the brains of all pups. As such, the AH-D peptide therapy demonstrates the potential of addressing two key challenges associated with ZIKV infection: 1) transport across intact BBB leading to suppression of viral replication in ZIKV-infected brains and 2) therapeutic inhibition of CZS effects in the offspring of pregnant ZIKV-infected mice. Although AH-D peptide treatment prevented ZIKV infection in foetal brain and reduced foetal mortality, it could not completely rescue ZIKV-induced birth defects, suggesting that host responses unleashed by infection are also important during ZIKV pathogenesis. In this context, it will be important to evaluate whether the combination of neuroprotective drugs and antiviral drugs could become an optimal treatment for CZI.

In conclusion, our results reveal that congenital ZIKV infection induces severe birth defects in offspring from the embryonic phase until adulthood. Those consequences are potentiated by ADE and associated with enhanced MIA. Altogether, the results suggest that MIA and ADE are possible mechanisms involved in the generation of CZS and provide further insights into the long-term consequences of early maternal ZIKV infection and outcomes of congenital ZIKV infection in adulthood. Finally, our results suggest that antiviral treatments, such as AH-D peptide therapy, may be beneficial during early maternal ZIKV infection.

Funding

This work was supported by the National Institute of Science and Technology in Dengue and Host-microorganism Interaction (INCT dengue), which is a programme sponsored by the Brazilian National Science Council (CNPq, Brazil) and the Minas Gerais Foundation for Science (FAPEMIG, Brazil). This work also received support from Financiadora de Estudos e Pesquisa (FINEP 01.16.0050.00, Brazil), PP SUS: APQ-03744-17, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 425359/2018, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES), FAPEMIG (APQ-02281-18), and by the National Research Foundation of Singapore through an NRF Fellowship grant (NRF-NRFF2011-01) and the Centre for Precision

Biology at Nanyang Technological University. Funders had no role in study design, data collection, data analysis, interpretation of data, or writing of the report.

Declaration of interests

N.-J.C. is a co-inventor on U.S. Patent No. 8,728,793. The other authors declare no competing interest.

Author contributions

V.N.C., N.-J.C., A.C.P.O., M.M.T., V.V.C. and D.G.S. planned the studies. V.N.C., G. F., D.C.M., V.T.S., C.M.Q.-J., A.L.B.M., A.F.A.F., C.D.F.S., T.P.M., V.F.Q., A.C.F.D., K.T.O.S., I.P., A.L.C.V.R., L.C.S., F.A.G.M., N.T.W., M.A.P.O., S.M., T.S., G.P.G., conducted experiments. V.N.C., G.F., D.C.M., V.T.S., C.M.Q.-J., A.F.A.F., K.T.O.S., S.M., G.P.G., J.A.J., F.M.S., M.F.D.M., E.M.A.M.M., F.M.R., G.M.J.C., A.L.T., N.-J.C., A.C.P.O., M.M.T., V.V.C., D.G.S. interpreted the results. V.N.C., G.F., V.T.S., A.F.A.F., S.M., J.A.J., F.M.S., F.M.R., G.M.J.C., N.-J.C., A.C.P.O., M.M.T., V.V.C., D.G.S. wrote the first draft of the paper. F.M.R., N.-J.C., M.M.T., V.V.C., D.G.S. obtained funding. All authors reviewed, edited and approved the paper.

Acknowledgement

I. Marcal, T. Colina, G. dos Santos, and F. Assis are acknowledged for technical assistance with experiments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.014>.

References

- Brasili P, Pereira JP, Moreira ME, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med* 2016;375:2321–34.
- Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians. *JAMA Pediatr* 2017;171:288–95.
- Hoeh B, Schaub B, Funk AL, et al. Pregnancy outcomes after ZIKV infection in French territories in the Americas. *N Engl J Med* 2018;378:985–94.
- Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: implications for neuropsychiatric disorders. *Science* (80-) 2016;353:772–7.
- Knaeuper I, Chicha L, Britschgi M, et al. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol* 2014;10:643–60.
- Butler D. Brazil asks whether Zika acts alone to cause birth defects. *Nature* 2016;535:475–6.
- Polonio CM, de Freitas CI, Zanluqui NG, Peron JPS. Zika virus congenital syndrome: experimental models and clinical aspects. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2017;23:1–9.
- Mahalingam S, Tebeira MM, Halstead SB. Zika enhancement: a reality check. *Lancet Infect Dis* 2017;17:686–8.
- Costa VV, Fagundes CT, Valadão DF, et al. Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of dengue virus infection induces severe disease in immunocompetent mice. *Med Microbiol Immunol* 2014;203:231–50.
- Xavier-Neto J, Carvalho M, Pascoalino B dos S, et al. Hydrocephalus and arthrogryposis in an immunocompetent mouse model of ZIKA teratogeny: a developmental study. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:1–29.
- Radyushkin K, Hammerschmidt K, Boretius S, et al. Neurologin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. *Genes Brain Behav* 2009;8:416–25.
- De Castro BM, Pereira GS, Magalhães V, et al. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. *Genes Brain Behav* 2009;8:23–35.
- Funchal C, Dani C. Neurociências: Modelos Experimentais Em Animais. Porto Alegre: EdIPUCRS, Editora Universitária Metodista; 2014.
- da Silveira VT, Medeiros D de C, Ropke J, et al. Effects of early or late prenatal immune activation in mice on behavioral and neuroanatomical abnormalities relevant to schizophrenia in the adulthood. *Int J Dev Neurosci* 2017;58:1–8.
- Bitanhiwre BKY, Peleg-Raibstein D, Mouttet F, Feldon J, Meyer U. Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Schizophr Res* 2010;117:273–4.
- Jackman JA, Costa VV, Park S, et al. Therapeutic treatment of Zika virus infection using a brain-penetrating antiviral peptide. *Nat Mater* 2018;17:102–8.
- Doria JC, de Souza JM, Silva FR, et al. The mGluR5 positive allosteric modulator VU0409551 improves synaptic plasticity and memory of a mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 2018;147:222–39.
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 2005;1035:24–31.
- Foureaux G, Franca JR, Nogueira JC, et al. Ocular inserts for sustained release of the angiotensin-converting enzyme 2 activator, diminazene aceturate, to treat glaucoma in rats. *PLoS One* 2015;10:1–18.
- Costa GMJ, Lacerda SMSN, Figueiredo AFA, Leal MC, Rezende-Neto JV, França LR. Higher environmental temperatures promote acceleration of spermatogenesis in vivo in mice (*Mus musculus*). *J Therm Biol* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.07.010>.
- Johnson L, Neaves WB. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules and sperm production in stallions. *Biol Reprod* 1981;24:703–12.
- Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 1946. <https://doi.org/10.1002/ar.1090940210>.
- Amann RP. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. *Am J Anat* 1962;110:69–78.
- Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>.
- Macari S, Sharma IA, Wyatt A, et al. Lactation induces increases in the RANK/RANKL/OPG system in maxillary bone. *Bone* 2018;110:160–9.
- Rathore APS, Saron WAA, Lim T, Jahan N, St John AL. Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus-induced microcephaly in fetuses. *Sci Adv* 2019;5 [eaa3208].
- Meyer U. Prenatal poly(I:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biol Psychiatry* 2014;75:307–15.
- Graham AM, Rasmussen JM, Rudolph MD, et al. Maternal systemic Interleukin-6 during pregnancy is associated with Newborn amygdala phenotypes and subsequent behavior at 2 years of age. *Biol Psychiatry* 2018;83:109–19.
- Rudolph MD, Graham AM, Feczko E, et al. Maternal IL-6 during pregnancy can be estimated from newborn brain connectivity and predicts future working memory in offspring. *Nat Neurosci* 2018;1–8.
- Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through Interleukin-6. *J Neurosci* 2007;27:10695–702.
- Paul LM, Carlin ER, Jenkins MM, et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Clin Transl Immunol* 2016;5:e117.
- Castanha PMS, Nascimento EJM, Braga C, et al. Enhancement of Zika infection by dengue-specific antibodies does not alter the production of interleukin 6 in FcγRIII-expressing K562 cells. *J Infect Dis* 2017;216:614–5.
- Hueston L, Ramirez R, Mahalingam S. Enhancement of Zika infection by dengue virus-specific antibody is associated with low levels of antiviral factors. *J Infect Dis* 2017;216:612–4.
- Dejnirattai W, Supasa P, Wongwiwat W, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nat Immunol* 2016;17:1102–8.
- Rogers TF, Goodwin EC, Briney B, et al. Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. *Sci Immunol* 2017;2:eaar8089.
- Bardina SV, Bunduc P, Tripathi S, et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antiviral immunity. *Science* (80-) 2017;356:175–80.
- McCracken MK, Gromowski GD, Friberg HL, et al. Impact of prior flavivirus immunity on Zika virus infection in rhesus macaques. *PLoS Pathog* 2017;13:1–22.
- Pantoja P, Pérez-Guzmán EX, Rodríguez IV, et al. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. *Nat Commun* 2017;8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15674>.
- Terzian ACB, Schanoski AS, De Oliveira Mota MT, et al. Viral load and cytokine response profile does not support antibody-dependent enhancement in dengue-primed Zika virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 2017;65:1260–5.
- Wen J, Elong Ngono A, Angel Regla-Nava J, et al. Dengue virus-reactive CD8+ T cells mediate cross-protection against subsequent Zika virus challenge. *Nat Commun* 2017;8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01669-z>.
- Ribeiro GS, Kikiti M, Tauro JB, et al. Does immunity after Zika virus infection cross-protect against dengue? *Lancet Glob Health* 2018;6:e140–1.
- Rodríguez-Barraquer I, Costa F, Nascimento EJM, et al. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. *Science* (80-) 2019;363:607–10.
- Gilmore JH, Jarskog LF, Vadlamudi S, Lauder JM. Prenatal infection and risk for schizophrenia: IL-1β, IL-6, and TNFα inhibit cortical neuron dendrite development. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:1221–9.
- Cugula IR, Fernandes BR, Russo FB, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 2016;534:267–71.
- Hirsch AJ, Roberts VHJ, Grigsby PL, et al. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. *Nat Commun* 2018;9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02499-9>.
- Dudley DM, Van Rompay KK, Coffey LL, et al. Miscarriage and stillbirth following maternal Zika virus infection in nonhuman primates. *Nat Med* 2018;24:1104–7.
- de Araújo TVB, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda Filho D, et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. *Lancet Infect Dis* 2018;18:328–36.
- Miner JJ, Cao B, Gowero J, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell* 2016;165:1081–91.
- Satterfield-Nash A, Kotzky K, Allen J, et al. Health and development at age 19–24 months of 19 children who were born with microcephaly and laboratory evidence of congenital Zika virus infection during the 2015 Zika virus outbreak – Brazil, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2017;66:1347–51.

- [50] Nem de Oliveira Souza I, Frost PS, França JV, et al. Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice. *Sci Transl Med* 2018;10 [eaa2749].
- [51] Li C, Xu D, Ye Q, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell* 2016;19:120–6.
- [52] Shi Y, Li S, Wu Q, et al. Vertical transmission of the Zika virus causes neurological disorders in mouse offspring. *Sci Rep* 2018;8:1–14.
- [53] Wu KY, Zuo GL, Li XF, et al. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. *Cell Res* 2016;26: 645–54.
- [54] Julander JG, Siddharthan V, Park AH, et al. Consequences of in utero exposure to Zika virus in offspring of AG129 mice. *Sci Rep* 2018;8:9384.
- [55] de Paula Freitas B, Ko AI, Khouri R, et al. Glaucoma and congenital Zika syndrome. *Ophthalmology* 2017;124:407–8.
- [56] Yeppez JB, Murati FA, Pettito M, et al. Ophthalmic manifestations of congenital Zika syndrome in Colombia and Venezuela. *JAMA Ophthalmol* 2017;135:440–5.
- [57] Mohr EL, Block LN, Newman CM, et al. Ocular and uteroplacental pathology in a macaque pregnancy with congenital Zika virus infection. *PLoS One* 2018;13: 1–28.
- [58] Strange DP, Green R, Siemann DN, Gale M, Verma S. Immunoprofiles of human Sertoli cells infected with Zika virus reveals unique insights into host-pathogen crosstalk. *Sci Rep* 2018;8:1–15.
- [59] Stassen I, Armitage C, van der Heide D, Beagley K, Frentiu F. Zika virus in the male reproductive tract. *Viruses* 2018;10:198.
- [60] Robinson CI, Chong ACN, Ashbrook AW, et al. Male germ cells support long-term propagation of Zika virus. *Nat Commun* 2018;9:1–11.
- [61] Spencer JL, Lahon A, Tran LL, et al. Replication of Zika virus in human prostate cells: a potential source of sexually transmitted virus. *J Infect Dis* 2017. <https://doi.org/10.1093/infdis/jwx436>.
- [62] Govero J, Esakly P, Scheaffer SM, et al. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature* 2016;540:438–42.
- [63] Shan C, Muriato AE, Jagger BW, et al. A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. *Nat Commun* 2017;8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00737-8>.
- [64] Kumar A, Jovel J, Lopez-Orozco J, et al. Human sertoli cells support high levels of zika virus replication and persistence. *Sci Rep* 2018;8:1–11.
- [65] Alvino ACMI, de Mello LRM, de Oliveira JDAMM. Association of arthrogryposis in neonates with microcephaly due to Zika virus – a case serie. *Rev Bras Saúde Matern Infant* 2016;16:S83–8.
- [66] Shim JH, Stavre Z, Gravallese EM. Bone loss in rheumatoid arthritis: basic mechanisms and clinical implications. *Calcif Tissue Int* 2018;102:533–46.
- [67] Bayless NL, Greenberg RS, Swigut T, Wysocka J, Blish CA. Zika virus infection induces cranial neural crest cells to produce cytokines at levels detrimental for neurogenesis. *Cell Host Microbe* 2016;20:423–8.
- [68] Jackman JA, Shi P-Y, Cho N-J. Targeting the Achilles heel of mosquito-borne viruses for antiviral therapy. *ACS Infect Dis* 2018;5:4–8 [acsinfecdis.8b00286].
- [69] Sapparapu G, Fernandez E, Kose N, et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature* 2016;540:443–7.
- [70] Yu Y, Deng YQ, Zou P, et al. A peptide-based viral inactivator inhibits Zika virus infection in pregnant mice and fetuses. *Nat Commun* 2017;8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15672>.

ANEXO B – Capítulo de livro publicado

***Zika virus* Infection and Potential Mechanisms Implicated in Neuropsychiatric Complications**



Fernanda Martins Marim, Vidyleison Neves Camargos,
Celso Martins Queiroz-Junior, and Vivian Vasconcelos Costa

Abstract *Zika virus* (ZIKV) emerged as a global health threat due to its association with severe outcomes in humans, including microcephaly and other neurological complications. ZIKV replication and induction of neuronal death are considered key factors for severe ZIKV-induced disease. Understanding the pathogenic mechanisms induced by ZIKV infection is crucial to identify potential therapeutic targets that may prevent or at least minimize the consequences in early phases of disease and adulthood. This chapter will discuss how ZIKV emerged in the past few years, will describe some aspects of the infection and, finally, will focus on the evidence of neuropathological mechanisms of the disease in humans and experimental models and its potential neuropsychiatric outcomes. The mechanisms explored are: (i) infection and virus replication, activation and apoptosis of neural progenitor cells, mature neurons and glial cells with concomitant induction of neuroinflammation; (ii) induction of neuronal excitotoxicity; and (iii) autophagy modulation during ZIKV infection.

Keywords *Zika virus* (ZIKV) · Neuroinflammation · Congenital zika syndrome (CZS) · Neuronal cell death · Glutamate · Neuronal excitotoxicity · Autophagy

F. M. Marim

Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences (ICB), Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

V. N. Camargos

Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences (ICB), Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

C. M. Queiroz-Junior

Department of Morphology, Institute of Biological Sciences (ICB), Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

V. V. Costa (✉)

Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences (ICB), Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

Department of Morphology, Institute of Biological Sciences (ICB), Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

© Springer Nature Switzerland AG 2020

207

A. L. Teixeira et al. (eds.), *Perinatal Inflammation and Adult Psychopathology*,

Progress in Inflammation Research 84, https://doi.org/10.1007/978-3-030-39335-9_12

viviancosta@gmail.com

1 Introduction

1.1 Zika Virus

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus that emerged as a global health threat due to its association with severe outcomes, such as Guillain–Barré syndrome (GBS) in adults and birth defects associated with congenital infection. It was initially isolated from sentinel rhesus macaques in Zika Forest, Uganda, in April 1947 [1], and first reported in humans in Nigeria, in 1954 [2]. The first epidemic episode occurred in 2007 when over 70% of the population of Yap Island (Micronesia) got infected, although no hospitalization or death related to ZIKV-infection was registered [3, 4]. Later, an epidemic in French Polynesia between October 2013 and April 2014 resulted in almost 32,000 infections with ZIKV and an unexpected 20-fold increase in GBS incidence, suggesting an association between ZIKV infection and GBS [5–9]. Then, ZIKV emerged in Brazil on March 2015 [10] causing a major epidemic that led to 440,000–1,300,000 infections [11] followed by a huge increase in microcephaly and GBS incidence [12].

ZIKV belongs to *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus, Riboviria realm, which includes other public health relevant pathogens, such as *Dengue virus* (DENV), *Yellow fever virus* (YFV), *West Nile virus* (WNV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), among others [13]. Although there are two lineages described so far, African and Asian [14], all viral samples isolated during epidemics in the Americas and Pacific regions belong to the latter lineage [15]. There are two natural viral transmission cycles: an enzootic cycle between nonhuman primates and sylvatic species of *Aedes* spp. and an urban cycle in which the virus is transmitted between humans and peridomestic *Aedes* spp., mainly the prevalent species *Aedes aegypti* [16]. In addition to the spread through infected *Aedes* mosquitoes, other relevant routes of ZIKV infection are blood transfusion, sexual and vertical transmission in humans [17, 18].

ZIKV transmission was registered in more than 80 countries and territories between 2015 and 2017 [19]. Even though the majority of countries in the Americas and the Caribbean experienced a decline in Zika cases since later 2017, virus re-introduction and exposure to naïve population may occur, especially in areas with arthropod vector circulation [20].

1.2 Clinical Presentation and Its Underlying Physiopathology

Almost 80% of ZIKV cases in humans are asymptomatic. Acute symptomatic cases present clinical signs similar to other arboviruses of medical relevance, such as Chikungunya virus (CHIKV) and DENV, making the diagnosis challenging in endemic countries with circulation of multiple arboviruses. Some clinical and laboratory variables may help in the accurate diagnosis of the infection (Table 1) [21].

Table 1 Clinical signs of ZIKV, DENV, and CHIKV

Clinical manifestations	Zika virus	Dengue virus	Chikungunya virus
Fever	Mild	High	High
Rash	High	Low	Low
Arthralgia	Low	Low	High
Hemorrhage	No	High	No
Guillain–Barré syndrome	Low	Very low	Very low
Microcephaly	High	Absent	Absent

Modified from Karkhah et al. [25]

A hallmark of ZIKV infection in humans is the associated neurological complications: congenital microcephaly, GBS, myelitis and meningoencephalitis [5, 22–24]. After transmission to the human host, ZIKV incubation period lasts around 3–10 days, triggering symptoms with different levels of severity including fever, rash, arthritis or arthralgia, myalgia, headache, and conjunctivitis. Some nonspecific clinical manifestations, such as cough, sore throat, vomiting, and nausea, can be observed in a few cases [25].

Regarding the neurological outcomes induced by ZIKV infection, an unexpected increase in GBS cases (42 cases, representing a 20-fold increase in the incidence) occurred in the French Polynesia population during the epidemic of 2013–2014 [6]. Increased numbers of neurological manifestations in adults (manifested as GBS) and in infants born to infected mothers (microcephaly) also occurred in Brazil. According to the Pan American Health Organization alert [26], 76 patients with neurological syndromes and a recent history of ZIKV infection were identified, 42 of whom were diagnosed as GBS [26]. In the reported cases associated with ZIKV, it was suggested that GBS had an electrophysiological pattern compatible with acute motor axonal neuropathy (not necessarily related to neuronal cell death), resulting in generalized muscular weakness, with gait impairment and signs of facial paralysis [9, 22].

In 2016, the causal link between ZIKV infection and birth defects was confirmed [17, 27, 28] and the World Health Organization (WHO) called Zika as a global health emergency [29] that ended in November 2016 [30]. ZIKV identification in fetal brain samples from infected mothers provided evidence that ZIKV is able to break through the biological placental barrier to infect developing neural cells [28], leading to neuronal death and consequently reduction of the occipital-frontal head circumference of the newborn below the average of its gestational age, gender, and race, a condition known as microcephaly [31, 32]. Then, the WHO adopted additional diagnostic criteria for ZIKV infection beyond head circumference measurement in newborns. These include evaluation of the presence of ophthalmological and auditory complications, and changes in bone and joint formation, suggesting that severe microcephaly is only the “tip of the iceberg.” This scenario is even more worrying since many children who were born in Brazil from the recent epidemic in 2015 and considered healthy at the time, may develop important consequences in the future [17, 33]. The risk of microcephaly may range from 0.88% to 13.2% if ZIKV

infection occurs in the first trimester of pregnancy. However, little is known about the neurological and psychiatric consequences in the long term. Ongoing follow-up studies with children affected by ZIKV during the recent epidemic in Brazil will help to address these questions. Accordingly, Satterfield-Nash et al. [41] showed that among 19 children with the diagnosis of microcephaly, who were followed from birth until 24 months of age, the majority presented severe motor dysfunction, visual and auditory abnormalities, epilepsy, and sleep problems. Migration, organization, and neuronal myelination may be impaired by central nervous system (CNS) infection, leading to different conditions, such as brain malformations and “functional” neuropsychiatric syndromes, including intellectual disability and autism.

According to Moore et al. [34], five important features differentiate congenital Zika syndrome from other congenital infections: severe microcephaly with the partially collapsed skull, thin cerebral cortices with subcortical calcifications, macular scarring and focal pigmentary retinal mottling, congenital contractures, and also marked early hypertonia with symptoms of extrapyramidal involvement.

Microcephaly may develop during the gestational period or after the birth of the neonate [8, 35, 36]. The first is usually caused by changes in neurogenesis or death of neuronal progenitor cells (NPCs) [8]. Experimental evidence has shown that the regulation of NPC numbers and subtypes is essential for controlling brain size and morphology. For example, significant reduction in the number of these cells due to cell death, cell cycle arrest, or premature neuronal differentiation can reduce the size of the developing brain and, consequently, induce microcephaly [28, 37–39]. Microcephaly seems to be the worst scenario, but neonates born to ZIKV-infected mothers presented other neurological and fetal development manifestations defined as congenital Zika syndrome [40]. Experimental models corroborate this. Nem de Oliveira Souza and colleagues [42], using Swiss mice inoculated with ZIKV at day three after natural birth, showed the occurrence of postnatal microcephaly and behavioral changes during adulthood, as demonstrated by the increase in incidence of seizures, motor, and cognitive dysfunctions in the offspring [42]. ZIKV maternal infection of mice lacking type I and II Interferon (IFN) receptors resulted in transient hearing loss as well as a restriction of offspring growth, although no motor or cognitive deficits were observed in adulthood [43]. In a model of maternal infection during fetal development, DENV-specific antibodies in pregnant mice infected with ZIKV increased vertical transmission of ZIKV and led to a phenotype consistent with microcephaly which was dependent on the neonatal Fc receptor, FcRN [35]. Camargos and colleagues [36] have recently shown that congenital ZIKV infection induced several congenital deficiencies in immunocompetent mice, from embryonic phase to adulthood, such as decreased total brain volume, ophthalmologic abnormalities, changes in testicular morphology, and rupture in bone microarchitecture. Moreover, treatment with an antiviral amphipathic α -helical (AH) peptide during the early stages of pregnancy seems beneficial during early maternal infection by ZIKV.

Although ZIKV presents tropism to several body tissues and fluids, including brain, eyes, testes, female genital tract, placenta, spleen, liver, saliva, tears, semen, and urine [44], it is the nervous system tropism that accounts for most of its clinical relevance. ZIKV can infect almost all cells of the brain, from neurons and glial cells

to endothelial cells and pericytes [45]. Such tropism potentially impairs brain growth and results in microcephaly and other neurological conditions [44, 46]. The mechanism by which ZIKV exerts these effects has been recently investigated and involves: (i) induction of neuronal excitotoxicity [45]; (ii) infection, activation, and apoptosis of neural progenitor cells, mature neurons, and glial cells with concomitant inflammation [46–48]; (iii) and neuronal autophagy [49]. In the following sections, we will describe these mechanisms.

2 Neuronal Death Induced by ZIKV

2.1 ZIKV-Induced Excitotoxicity

ZIKV exhibits high neurotropism and can cause a massive neuronal damage, especially to NPCs [46, 50]. The CNS utilizes glutamate as the major excitatory neurotransmitter. In homeostatic conditions, glutamate plays a key role in neural development, synaptic plasticity, learning, and memory [51]. Once released, glutamate exerts its effects via activation of different ionotropic and metabotropic receptors. The metabotropic receptors are G-coupled protein receptors named mGluR, and based on sequence homology, second messenger coupling, and pharmacology, they are categorized into three groups: group I (mGluR 1 and 5), group II (mGluR 2 and 3), and group III (mGluR 4, 6, 7, 8). The ionotropic receptors are voltage-dependent ionic channels, and the three main ionotropic receptors are N-methyl-D-aspartate (NMDAR), α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptor (AMPA), and kainate receptor (KAR) [52, 53].

NMDAR-mediated cell signaling pathways located at synaptic sites are involved in neuronal survival as well as in neuroplasticity [54]. NMDARs are calcium-permeable cation channels widely distributed in neurons, inducing different intracellular responses [55]. They are composed of four subunits derived from three families: GluN1, GluN2, and GluN3, forming a heteromeric structure. GluN1 interacts with the GluN2 or GluN3 subunits to form a functional receptor. Classically, NMDAR requires two GluN1 subunits, which bind to glycine, and two GluN2 subunits that bind to glutamate. The activation of the NMDA receptor requires two molecules of glutamate and two molecules of glycine. Glutamate binding and activation of NMDA receptors open the cation channel within the receptor resulting in neuronal depolarization by triggering NMDAR signaling dependent on intracellular Ca^{2+} . The activation of synaptic NMDARs stimulates the induction of genes related to plasticity and maintenance of neuronal homeostasis. However, an overactivation of NMDA receptors can deregulate cell homeostasis, leading to neuronal death, a phenomenon called excitotoxicity. Actually, excitotoxicity is an induced neuronal death process in response to different insults, such as ischemia, traumatic brain injury, viral infections, and neurodegenerative conditions [56, 57].

Glutamate-induced excitotoxicity and neuronal damage is mediated mainly by NMDA receptors. Indeed, the use of NMDAR antagonists is capable of modulating

receptor activity negatively and preventing neuronal death both in vivo and in vitro. In the context of ZIKV infection, the blockade of NMDAR by an FDA approved allosteric antagonist used to treat Alzheimer's disease, Memantine, prevented the increase of intraocular pressure, and reduced microglial activation and neurodegeneration induced by ZIKV in the brain of type I interferon (α/β) receptor (IFNAR^{-/-}) deficient mice [45]. In vitro studies confirmed these findings and showed that ZIKV actively replicates in primary neurons triggering excitotoxicity and leading to massive decrease of synapses and neuronal cell death [45, 58]. Olmo et al. [59] also demonstrated that ZIKV induces cellular apoptosis through a nonautonomous mechanism dependent on increased levels of extracellular glutamate and production of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β . Together these factors induced NMDAR's overactivation by promoting excitotoxicity and, consequently, neuronal cell death. Interestingly, the single blockade of TNF- α or IL-1 β with etanercept or IL-1RA, respectively, resulted in partial amelioration of Ca²⁺ intake and neuronal cell death. Similarly, treatment with Ifenprodil, a GluN2B specific-subunit NMDAR, was able to decrease intracellular Ca²⁺ levels and increase the activation of the pathways involved in cell survival, including Extracellular signal-regulated kinases (ERK) and cAMP response element-binding protein (CREB).

In sum, NMDAR blockade by Memantine prevented ZIKV-induced cell death in vivo and in vitro without affecting the ability of the virus to replicate in these systems. Meanwhile, viral replication in target cells seems to be important to neuronal cell death induction [60, 61]. Jackman et al. [62] have shown that the therapeutic administration of brain-penetrating antiviral peptide (AH-D) to ZIKV-infected mice protected against mortality and markedly reduced clinical symptoms, suppressed efficiently viral load and neuroinflammation, mitigating neurodegeneration, and brain damage. Furthermore, AH peptide protected against lethal ZIKV infection in primary neuronal cells and exhibited antiviral activity in vitro [60–65] and in vivo, in both adult and offspring of ZIKV-infected dams [36, 60].

It is important to evaluate whether the combination of neuroprotective drugs, such as Memantine, and antiviral drugs could be an effective strategy against ZIKV infection and related complications. Future approaches must also target other mechanisms of neuronal cell damage resulting from ZIKV infection. The use of these drugs might open new perspectives for the treatment of ZIKV infection, especially for patients at risk of complications, such as pregnant women during the early stages of pregnancy.

2.2 ZIKV-Induced Neuronal Death Is Associated With Microgliosis and Astrogliosis

Along with the mechanisms depicted above, nonneuronal cells can contribute to ZIKV-induced neuronal death. Although ZIKV is characterized by neurotropism and neurovirulence, the virus can infect nonneuronal cells of the CNS, including microglia and astrocytes [47, 48, 66, 67].

Microglia cells are the brain's resident macrophages that deal with tissue insults. In homeostatic conditions, microglia are characterized by a small cell body and high numbers of ramifications actively "looking for" signs of pathogens and damage. When challenged, these cells become activated: their processes retract completely, the cell body changes into a round shape so they can move, release mediators, and phagocytose more efficiently [68]. Astrocytes are the other abundant glial cell type of the CNS. They provide neuronal support in homeostatic conditions, but also become immunologically active after neural insults. Astrocytes keep healthy the chemical environment and uptake neurotransmitters in order to allow an optimal function of neurons. In response to challenges, such as viral infections, these cells can increase in number and change their morphology and function. This is known as astrogliosis, a phenomenon quite relevant in the brain's active response to potential damages [69]. Both microglia and astrocytes synthesize a plethora of mediators, including IL-1 β , TNF- α , glutamate, nitric oxide (NO), and others, that can trigger neuronal death after ZIKV infection [45, 48, 59, 67, 70–72].

Microglia activation and astrogliosis have already been detected in the ZIKV-infected nervous tissue. The brain tissues of microcephalic ZIKV-positive neonates with fatal fate exhibited high numbers of S100 $^+$ -astrocytes and CD68 $^+$ or CD163 $^+$ -microglia/macrophages among the inflammatory cells of parenchyma [48]. Similarly, ZIKV-infected microglia-like and astrocyte-like cells were frequently observed in the brain of newborns with microcephalia [71]. Noteworthy, these cells were found especially in cortical areas with neuronal depopulation. Murine experimental data mimicked this human evidence [45, 59]. Intracerebral inoculation of embryonic mice with ZIKV triggered extensive microglial activation and astrogliosis as detected by IBA-1 $^+$ and GFAP $^+$ immunostaining, respectively. Such phenotype was associated with significant death of NPC and neurons in the developing brains. ZIKV infection culminated in increased caspase-3 and TUNEL staining of NPC and neurons, which are classical apoptotic markers [73, 74].

Besides direct ZIKV-induced neuronal damage, apoptosis can result from mediators released by the activated microglia. There is strong evidence supporting the role of proinflammatory cytokines in neuronal death *in vivo* and *in vitro*. However, it is still debatable whether the cause of neuronal death is mainly due to direct neurotoxicity or secondary to the activation of microglia and astrocytes.

ZIKV-infected neurons express high levels of TNF- α , IL-1 β , and glutamate which, in turn, trigger cell death of uninfected neurons [45, 59]. Regarding glia activation, *in vitro* data clearly show that ZIKV induces inflammasome activation in glial cells which finally results in the release of IL-1 β [67, 70, 72]. Similarly, inflammasome activation and IL-1 β , IL-18, IL-33 expression were detected in the neural parenchyma of fetal ZIKV-induced microcephaly cases [71]. Azevedo et al. [48] also observed increased expression of IL-1 β and TNF- α in the ZIKV-infected brain samples concurrent with apoptotic neuronal events. These cytokines released by glial cells, especially TNF- α and IL-1 β , can induce neuronal apoptosis by activating caspase-8 and necroptosis when RIP1, RIP3, and MLKL, but not caspase-8, are activated [75]. Accordingly, the blockade of TNF- α or IL-1 β with etanercept and IL-1RA, respectively, resulted in partial amelioration of Ca $^{2+}$ intake and neuronal

cell death [59]. Other mechanisms may include release of Fas ligand and/or cathepsin B by activated glial cells that can be neurotoxic and trigger neuronal apoptosis [76, 77].

Aside from proinflammatory cytokines, the mononuclear inflammatory infiltrate, also containing glial cells, was positive for the expression of iNOS and arginase 1 in the neural parenchyma of ZIKV-infected brains [48, 71]. The expression of these enzymes was intense in areas containing dead neurons, including necrotic, apoptotic, and vacuolated neurons. Usually, iNOS expression is not constitutive in the brain. It is the challenge associated with ZIKV infection (and other stressing agents) that raises iNOS expression by microglia and astrocytes and, consequently, increases their potential neurotoxicity. In a plethora of cells, increasing iNOS and NO release can trigger necrosis of surrounding cells via inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase and glycolysis, or via inducing mitochondrial permeability transition. High NO levels can activate p53 oxidation, induce p38 MAPK pathway or stress the endoplasmic reticulum, triggering neuronal apoptosis [78]. Also, increased NO levels associated with microglial NADPH oxidase activation may result in neuronal apoptosis mediated by peroxynitrite. Moreover, NO can induce astrocytes to release glutamate, so excitotoxicity mechanisms can be activated [72, 79].

In addition to these potential mechanisms of ZIKV-induced neuronal death by nonneural cells, activated microglia can also phagocytose stressed-but-viable neurons, resulting in neuronal depopulation. The stress associated with the proinflammatory mediators released by glial cells may induce phosphatidylserine exposition by neurons, which, in turn, trigger their phagocytosis by active microglia. Peroxynitrite and glutamate, mediators already detected in ZIKV-infected brain tissues, can induce neurons to expose phosphatidylserine at least transiently, and this is a classical “eat-me” signal [80]. Therefore, besides the direct damage induced by ZIKV in the CNS, neuronal death can also occur indirectly via activated glial cells.

3 Autophagy Regulation During ZIKV Infection

Autophagy is a highly conserved intracellular process among eukaryotic organisms that involves cargo transportation from cytoplasm to lysosomes for subsequent degradation via double-membrane autophagosomes, contributing to the maintenance of cellular homeostasis [81]. This process occurs physiologically in almost all cells of an organism, though it has greater importance in specific cell types. Autophagy can also contribute to cell death when excessively induced [82]. In neurons, there are several molecules that are produced and degraded to maintain their dynamic functions. Due to its normally nondividing nature, tight control of autophagy is essential to sustain cell homeostasis and, as consequence, nervous system development, neuronal activity, and survival. Hence, defects in autophagy pathway are related to the development of several neurodegenerative diseases [83, 84].

The degradation-targeted content includes bulk cytoplasm, organelles, aggregate-prone proteins involved in neurodegenerative process and several pathogens [85].

There are three types of autophagy: (i) microautophagy, in which the cytoplasmic cargo is transported directly into lysosome for degradation mediated by acidic hydrolases; (ii) chaperone-mediated autophagy, in which unique proteins containing specific targeting motif are recognized and carried to lysosome by a chaperone complex; and (iii) macroautophagy, in which cytosolic material is degraded after sequestration into autophagosomes that subsequently fuses with lysosomes. The latter is the most investigated and will be referred here as autophagy [86, 87]. Autophagy can also be classified according to its specificity: the canonical or bulk autophagy as described above, which sequesters random components of cytosol for degradation, and the selective autophagy, which involves specialized autophagosomes confining substrates in a selective mode [88]. So far, studies have demonstrated a possible dual role for autophagy in terms of promotion and inhibition of viral replication.

Some studies have shown that ZIKV infection in vitro increases autophagy induction. Although autophagy can restrict viral replication by mediating viral protein degradation, it can be subverted by some viruses that use components of autophagy pathway to promote their own replication [89]. Liu et al. [90] investigated a transcription profile of *Drosophila* flies infected with model virus *Drosophila* C (DCV) and identified several induced genes related to “defense response to bacterium,” including *CG1667*, which is an important innate regulator gene and the fly ortholog of Stimulator of Interferon Gene (STING). ZIKV was also able to induce *dSTING* expression, which resulted in induced autophagy in the fly brain upon ZIKV-infection. Increased autophagosome formation was also observed in different cell types, such as primary skin human fibroblasts [89], human fetal neural stem cells (fNSC), mouse embryonic fibroblasts (MEFs), HeLa [91], human neural progenitor cells [92], human cytotrophoblasts JEG-3 [93], and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) [94]. Liang and colleagues [91] showed that ZIKV replication is reduced in cell lines lacking different autophagy proteins (Atg). Moreover, autophagy induction by rapamycin resulted in increased ZIKV replication in fNSCs and HeLa cells, while the inhibition of this process occurred upon 3-MA or chloroquine treatments and led to reduced ZIKV replication [91]. Liang and colleagues [91] showed that autophagy induction is mediated by viral NS4A and NS4B proteins which inhibit Akt-mTOR signaling pathway and contribute to neurogenesis impairment in fNSC [91]. In addition, Cao et al. [93] showed that autophagy is activated during ZIKV-infection of mouse placenta. Finally, ZIKV infection was reduced in placentas, but not in maternal serum or spleen, in mice lacking *Atg16L1*, a key gene in autophagy process. This resulted in decreased placental damage, fetal growth restriction, and viral loads [93]. These results suggest that ZIKV-induced autophagy contributes to viral replication and possibly to the pathogenesis of ZIKV infection.

On the other hand, the autophagy response during infection might result in different outcomes depending on the type of the target cell. Some studies have shown that autophagy can have protective effects upon ZIKV infection. Liu and collaborators [90] showed that ZIKV infection in *Drosophila* brains activates Immune Deficiency pathway (IMD) but not Toll pathway, followed by NF- κ B activation,

which was associated with limitation of viral replication. Viral restriction was associated with *d*STING-mediated autophagy activation upon ZIKV infection. Autophagy inhibition led to increased ZIKV RNA levels in whole flies and heads, culminating in fly death. When the specific autophagy cargo receptors Ref (2)P (p62 ortholog) and Bchs (ALFY ortholog) were depleted, increased ZIKV infection in whole flies and heads were observed only upon Ref (2)P blockade. Indeed, these results were confirmed when flies were fed with rapamycin, a potent activator of autophagy, which resulted in protection against ZIKV infection [90].

Finally, some studies have shown that, during flavivirus infection, there is a growth and expansion of endoplasmic reticulum (ER) membranes which is essential to viral replication complex formation [86, 95]. Lennemann and Coyne [96] showed that ZIKV is able to prevent ER degradation by antagonizing reticulophagy, a specific autophagy of ER. This inhibition is caused by viral protease NS3-mediated cleavage of reticulophagy regulator 1 (FAM134B), which blocks the reticulophagy-specific autophagosomes formation. Accordingly, increased viral replication was observed when FAM134B is downregulated by interference RNA (iRNA) in human brain microvascular endothelial cells. These findings suggest that ZIKV specifically target this pathway to promote viral replication [96]. Altogether, while bulk autophagy is upregulated to promote early ZIKV infection, the viral proteins act later to prevent reticulophagy in order to support viral replication [49, 86]. Nonetheless, these contradicting results highlight the importance of investigating tissue-specific responses during viral infection to define an appropriate therapeutic strategy against ZIKV infection.

4 Conclusion

ZIKV has emerged as a public health problem worldwide, especially due to its association with increased neurological conditions, such as microcephaly, GBS, and CSZ. ZIKV has remarkable tropism to the nervous system, infecting CNS cells, such as neuronal and glial cells. Some consequences of the infection involve massive neuronal damage and neurodegeneration, as well as astrogliosis and microgliosis. Mechanisms by which ZIKV induces cell death include the release of inflammatory mediators, such as TNF- α , IL-1 β , glutamate, and NO. Such inflammatory scenario culminates in massive intracellular Ca²⁺ influx and deregulated cell homeostasis, leading to neuronal excitotoxicity mediated by activation of nonneuronal cells. ZIKV replication by itself may induce neurodegeneration and glial cell activation. Finally, autophagy seems to play a dual role during ZIKV infection and neurodegeneration induction. These proposed mechanisms involved in ZIKV-induced neuronal death are illustrated in Fig. 1. Overall, it is important to continue investigating the mechanisms by which ZIKV induces neuronal death and whether the combination of neuroprotective and antiviral drugs could be an ideal treatment for ZIKV infection.

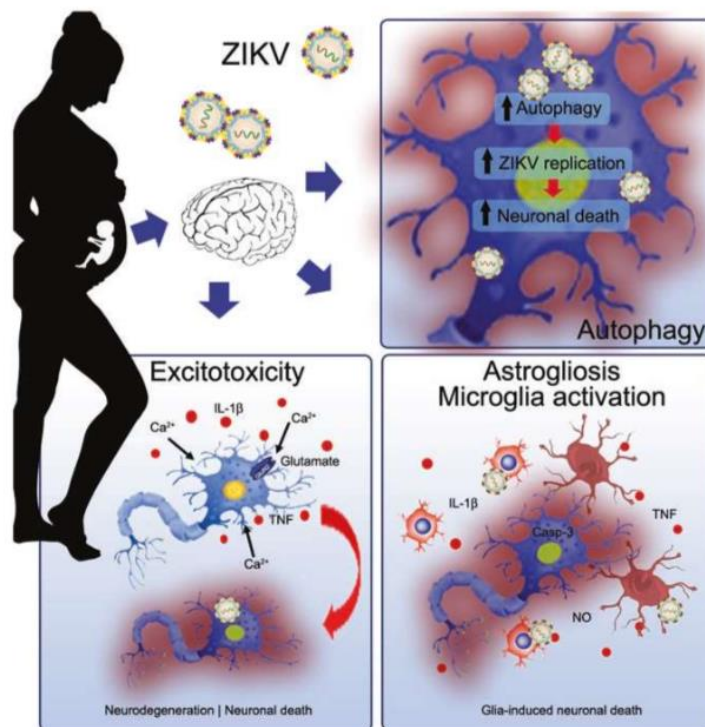


Fig. 1 Mechanisms involved in ZIKV-induced neuronal death. ZIKV infects neurons that release inflammatory mediators, including TNF- α , IL-1 β , nitric oxide, and glutamate, which lead to neuronal excitotoxicity. Glial cells can also be infected by ZIKV and trigger inflammatory-mediated neuronal death of infected and noninfected neurons via caspase-3 apoptosis. ZIKV increases neuronal autophagy which, in turn, favors ZIKV replication and, consequently, enhances neuronal death

References

1. Dick GWA, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46:509–20.
2. MacNamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1954;48:139–45.
3. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360:2536–43.
4. Faye O, Freire CCM, Iamarino A, et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2636.

5. Oehler E, Watrin L, Larre P, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* 2014;19:7–9.
6. Mallet H-P, Vial A-L, Musso D. Bilan De L'Epidemie a Virus Zika En Polynesie Francaise, 2013-2014. *Bull d'information Sanit Epidemiol Stat.* 2015;13:1–8.
7. Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:1960.
8. Woods CG. Human microcephaly. *Curr Opin Neurobiol.* 2004;14:112–7.
9. Willison HJ, Jacobs BC, Van Doorn PA. Guillain-Barré syndrome. *Lancet.* 2016;388:717–27.
10. Campos G, Bandeira A, Sardi S. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:1881.
11. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância da Saúde. Protocolo de Vigilância e Resposta À Microcefalia Relacionada À Infecção Pelo Vírus Zika. Versão 12–09/12/2015. 2015. p. 70.
12. Pan American Health Organization. Epidemiological update. Neurological syndrome, congenital anomalies, and Zika virus infection. 17 January 2016. World Health Organ. 2016.
13. Culshaw A, Mongkolsapaya J, Screaton G. The immunology of Zika virus. *F1000Res.* 2018;7:203.
14. Pettersson JH, Eldholm V, Seligman SJ, et al. How did Zika virus emerge in the Pacific Islands and Latin America? *mBio.* 2016;7:1–7.
15. Liu Z, Shi W, Qin C. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17:131–9.
16. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, et al. Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control. *Antivir Res.* 2016;130:69–80.
17. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika virus and birth defects – reviewing the evidence for causality. *N Engl J Med.* 2016;374:1981–7.
18. Kurscheidt FA, Mesquita CSS, Damke GMZF, et al. Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. *Nat Rev Urol.* 2019;16:211–30.
19. WHO. Zika Situation report – Zika virus, Microcephaly and Guillain-Barré syndrome. March 10; 2017. p. 1–5.
20. ECDC. Zika virus transmission worldwide. *Eur Cent Dis Prev Control* 2019;21.
21. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001477>.
22. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, et al. Guillain-Barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet.* 2016;387:1531–9.
23. Koppolu V, Shantha Raju T. Zika virus outbreak: a review of neurological complications, diagnosis, and treatment options. *J Neurovirol.* 2018;24:255–72.
24. Pinto-Dfiaz CA, Rodríguez Y, Monsalve DM, et al. Autoimmunity in Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection and beyond. *Autoimmun Rev.* 2017;16:327–34.
25. Karkhah A, Nouri HR, Javanian M, et al. Zika virus: epidemiology, clinical aspects, diagnosis, and control of infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37:2035–43.
26. Pan American Health Organisation. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. Pan American Health Organisation. 2015.
27. Brasil P, Pereira JP Jr, Raja Gabaglia C, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro – preliminary report. *N Engl J Med.* 2016; <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>.
28. Mlakar J, Korva M, Tul N, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med.* 2016;374:951–8.
29. Gulland A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *BMJ.* 2016;352:i657.
30. World Health Organization. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. WHO. 2016. <https://www.who.int/en/news-room/detail/18-11-2016-fifth-meeting-of-the-emergency-committee-under-the-inter>

- [national-health-regulations-\(2005\)-regarding-microcephaly-other-neurological-disorders-and-zika-virus.](#)
31. Devakumar D, Bamford A, Ferreira MU, et al. Infectious causes of microcephaly: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Infect Dis.* 2018;18:e1–13.
 32. Coulombier D, Danielsson N, Donachie A, et al. Rapid risk assessment: microcephaly in Brazil potentially linked to the Zika virus epidemic. ECDC. 2015.
 33. Simões-e-Silva AC, Moreira JM, Romanelli RMC, Teixeira AL. Zika virus challenges for neuropsychiatry. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2016;12:1747–60.
 34. Moore CA, Staples JE, Dobyms WB, et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians. *JAMA Pediatr.* 2017;171:288–95.
 35. Rathore APS, Saron WAA, Lim T, Jahan N, St. John AL. Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus–induced microcephaly in fetuses. *Sci Adv.* 2019;5:eaav3208.
 36. Camargos VN, Foureaux G, Medeiros DC. In-depth characterization of congenital Zika syndrome in immunocompetent mice: antibody-dependent enhancement and an antiviral peptide therapy. et al., *EBioMedicine.* 2019;1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.014>.
 37. Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, et al. Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. *Cell Stem Cell.* 2016;19:258–65.
 38. Lancaster MA, Renner M, Martin C-A, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* 2013;501:373–9.
 39. Buchman JJ, Tseng HC, Zhou Y, Frank CL, Xie Z, Tsai LH. Cdk5rap2 interacts with pericentrin to maintain the neural progenitor pool in the developing neocortex. *Neuron.* 2010;66:386–402.
 40. De Oliveira Melo AS, Aguiar RS, Amorim MMR, et al. Congenital Zika virus infection: beyond neonatal microcephaly. *JAMA Neurol.* 2016;73:1407–16.
 41. Satterfield-Nash A, Kotzky K, Allen J, et al. Health and development at age 19–24 months of 19 children who were born with microcephaly and laboratory evidence of congenital Zika virus infection during the 2015 Zika virus outbreak – Brazil, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2017;66:1347–51.
 42. Nem de Oliveira Souza I, Frost PS, França JV, et al. Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice. *Sci Transl Med.* 2018;10:eaar2749.
 43. Julander JG, Siddharthan V, Park AH, et al. Consequences of in utero exposure to Zika virus in offspring of AG129 mice. *Sci Rep.* 2018;8:9384.
 44. Miner JJ, Diamond MS. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe.* 2017;21:134–42.
 45. Costa V, Del Sarto J, Rocha RF, et al. N -methyl-d-aspartate (NMDA) receptor blockade prevents neuronal death induced by Zika virus infection. *MBio.* 2017;8:e00350–17.
 46. Tang H, Hammack C, Ogden SC, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell.* 2016;18:587–90.
 47. Chen J, Yang YF, Yang Y, et al. AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. *Nat Microbiol.* 2018;3:302–9.
 48. Azevedo RSS, de Sousa JR, Araujo MTF, et al. In situ immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. *Sci Rep.* 2018;8:1.
 49. Echavarría-Consuegra L, Smit JM, Reggiori F. Role of autophagy during the replication and pathogenesis of common mosquito-borne flaviviruses and alphaviruses. *Open Biol.* 2019;9:190009.
 50. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 2016;534:267–71.
 51. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.* 1994; <https://doi.org/10.1056/NEJM199403033300907>.
 52. Benarroch EE. NMDA receptors: recent insights and clinical correlations. *Neurology.* 2011;76:1750–7.

53. Kew JNC, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*. 2005;179:4–29.
54. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14:383–400.
55. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11:682–96.
56. Tehse J, Taghibiglou C. The overlooked aspect of excitotoxicity: glutamate-independent excitotoxicity in traumatic brain injuries. *Eur J Neurosci*. 2018:0–2.
57. Lipton SA, Nicotera P. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium*. 1998;23:165–71.
58. Gaburro J, Bhatti A, Sundaramoorthy V, et al. Zika virus-induced hyper excitation precedes death of mouse primary neuron. *Viro J*. 2018;15:1–13.
59. Olmo IG, Carvalho TG, Costa VV, et al. Zika virus promotes neuronal cell death in a non-cell autonomous manner by triggering the release of neurotoxic factors. *Front Immunol*. 2017;8:1–14.
60. Saiz J-C, Martín-Acebes MA. The race to find antivirals for Zika virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:1–9.
61. McArthur MA. Zika virus: recent advances towards the development of vaccines and therapeutics. *Viruses*. 2017;9 <https://doi.org/10.3390/v9060143>.
62. Jackman JA, Costa VV, Park S, et al. Therapeutic treatment of Zika virus infection using a brain-penetrating antiviral peptide. *Nat Mater*. 2018;1
63. Barrows NJ, Campos RK, Powell ST, et al. A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. *Cell Host Microbe*. 2016;20:259–70.
64. Adcock RS, Chu YK, Golden JE, Chung DH. Evaluation of anti-Zika virus activities of broad-spectrum antivirals and NIH clinical collection compounds using a cell-based, high-throughput screen assay. *Antivir Res*. 2017; <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.018>.
65. Xu M, Lee EM, Wen Z, et al. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nat Med*. 2016;22:1101–7.
66. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, et al. Axl mediates ZIKA virus entry in human glial cells and modulates innate immune responses. *Cell Rep*. 2017;18:324–33.
67. Tricarico PM, Caracciolo I, Crovella S, D'Agaro P. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;492:597–602.
68. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. 2007;10:1387–94.
69. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009; <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>.
70. Abreu CM, Gama L, Krasemann S, et al. Microglia increase inflammatory responses in iPSC-derived human brainspheres. *Front Microbiol*. 2018;9:1–12.
71. de Sousa JR, Azevedo RDS, Martins Filho AJ, et al. In situ inflammasome activation results in severe damage to the central nervous system in fatal Zika virus microcephaly cases. *Cytokine*. 2018;111:255–64.
72. Wang J, Liu J, Zhou R, et al. Zika virus infected primary microglia impairs NPCs proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;497:619–25.
73. Shao Q, Herrlinger S, Yang S-L, et al. Zika virus infection disrupts neurovascular development and results in postnatal microcephaly with brain damage. *Development*. 2016;143:4127–36.
74. Shao Q, Herrlinger S, Zhu Y-N, et al. The African Zika virus MR-766 is more virulent and causes more severe brain damage than current Asian lineage and dengue virus. *Development*. 2017;144:4114–24.
75. Christofferson DE, Li Y, Yuan J. Control of life-or-death decisions by RIP1 kinase. *Annu Rev Physiol*. 2013;76:129–50.
76. Taylor LD, Jones F, Kubota ESFCS, Pocock JM. Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor-induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. *J Neurosci*. 2005; <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4456-04.2005>.

77. Kingham PJ, Pocock JM. Microglial secreted Cathepsin B induces neuronal apoptosis. *J Neurochem.* 2001;76:1475–84.
78. Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide.* 2010;23:153–65.
79. Bal-Price A, Matthias A, Brown GC. Stimulation of the NADPH oxidase in activated rat microglia removes nitric oxide but induces peroxynitrite production. *J Neurochem.* 2002;80:73–80.
80. Brown GC, Neher JJ. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15:209–16.
81. Deng Z, Purtell K, Lachance V, Wold MS, Chen S, Yue Z. Autophagy receptors and neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol.* 2017;27:491–504.
82. Kourtis N, Tavernarakis N. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ.* 2009;16:21–30.
83. Kulkarni A, Chen J, Maday S. Neuronal autophagy and intercellular regulation of homeostasis in the brain. *Curr Opin Neurobiol.* 2018;51:29–36.
84. Lee J-A. Neuronal autophagy: a housekeeper or a fighter in neuronal cell survival? *Exp Neurobiol.* 2012;21:1.
85. Bento CF, Renna M, Ghislat G, et al. Mammalian autophagy: how does it work? *Annu Rev Biochem.* 2016;85:685–713.
86. Chiramel AI, Best SM. Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis. *Virus Res.* 2018;254:34–40.
87. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19:579–93.
88. Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell.* 2014;53:167–78.
89. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J Virol.* 2015;89:8880–96.
90. Liu Y, Gordesky-Gold B, Leney-Greene M, Weinbren NL, Tudor M, Cherry S. Inflammation-induced, STING-dependent autophagy restricts Zika virus infection in the *Drosophila* brain. *Cell Host Microbe.* 2018;24:57–68.e3.
91. Liang Q, Luo Z, Zeng J, et al. Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human Fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. *Cell Stem Cell.* 2016;19:663–71.
92. Souza BSF, Sampaio GLA, Pereira CS, et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Nat Publ Group.* 2016:1–13.
93. Cao B, Parnell LA, Diamond MS, Mysorekar IU. Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *J Exp Med.* 2017;214:2303–13.
94. Peng H, Liu B, Yves TD, et al. Zika virus induces autophagy in human umbilical vein endothelial cells. *Viruses.* 2018;10. <https://doi.org/10.3390/v10050259>.
95. Romero-Brey I, Bartenschlager R. Endoplasmic reticulum: the favorite intracellular niche for viral replication and assembly. *Viruses.* 2016;8:1–26.
96. Lennemann NJ, Coyne CB. Dengue and Zika viruses subvert reticulophagy by NS2B3-mediated cleavage of FAM134B. *Autophagy.* 2017;13:322–32.

**ANEXO C – Protocolos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da
Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), número 217/2017 e
194/2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento de um modelo embrionário de infecção pelo Zika virus para o estudo da patogênese da infecção e das alterações do neurodesenvolvimento da prole", protocolo do CEUA: 217/2017 sob a responsabilidade de Danielle da Gloria de Souza que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 02/10/2017.

Vigência da Autorização	02/10/2017 a 01/10/2022
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	84
Peso/Idade	1g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFN??R-/-
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	84
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFN??R-/-
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIIb-/- e FcgRIII-/-
Nº de animais	126
Peso/Idade	2g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIIb-/- e FcgRIII-/-
Nº de animais	126

Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	1g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	1g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	1g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	1g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFN γ R-/-
Nº de animais	3
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFN γ R-/-
Nº de animais	3
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente

Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFN??R-/-
Nº de animais	3
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / IFN??R-/-
Nº de animais	3
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIIb-/-
Nº de animais	21
Peso/Idade	1g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIIb-/-
Nº de animais	21
Peso/Idade	1g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIIb-/-
Nº de animais	21
Peso/Idade	1g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIII-/-
Nº de animais	21
Peso/Idade	1g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIII-/-
Nº de animais	21
Peso/Idade	1g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIII-/-
Nº de animais	21
Peso/Idade	1g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIIb-/-
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIIb-/-

Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIIb-/-
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIII-/-
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIII-/-
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo Knockout / FcgRIII-/-
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia

Considerações posteriores:

02/10/2017	Aprovado na reunião do dia 02/10/2017. Validade: 02/10/2017 à 01/10/2022
------------	--

Belo Horizonte, 18/06/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de alterações neurológicas latentes associadas à infecção congênita pelo Zika virus em camundongos imunocompetentes", protocolo do CEUA: 194/2019 sob a responsabilidade de Danielle da Gloria de Souza que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 21/10/2019.

Vigência da Autorização	21/10/2019 a 20/10/2024
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21

Peso/Idade	12g / 4(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	18
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	3
Peso/Idade	25g / 10(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

21/10/2019	Aprovado na reunião do dia 21/10/2019. Validade: 21/10/2019 à 20/10/2024
------------	--

Belo Horizonte, 18/06/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br