CECÍLIA BENAZZATO

**Modelagem celular de bebês nascidos com microcefalia causada
por infecção vertical por Zika vírus**

São Paulo

2021

CECÍLIA BENAZZATO

**Modelagem celular de bebês nascidos com microcefalia causada
por infecção vertical por Zika vírus**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Patricia Cristina Baleeiro Beltrão
Braga

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4050
FMVZ

Cecília Benazzato
Modelagem celular de bebês nascidos com microcefalia causada por infecção vertical
por Zika vírus / Cecília Benazzato. – 2021.
121 f. ; il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.

1. Zika vírus. 2. Microcefalia. 3. iPSC. 4. Modelagem de doenças. 5. SNC. I. Título.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 16 de março de 2021
CEUAX N [3924140916](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Equipe envolvida: Cecília Benazzato - (executante); Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga - (orientador);

Título do projeto: "Modelagem celular de bebês nascidos com microcefalia causada por infecção vertical por Zika Virus (ZIKV)".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 17/10/2018, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 22 de agosto de 2018.

PARECER 1405/CEPSH

CAAE nº 80437417.3.0000.5467

Protocolo CEPSh-ICB nº 1413/18

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Modelagem celular de bebês nascidos com microcefalia causada por infecção vertical por Zika Vírus**", das pesquisadoras Profa. Dra. **Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga** e aluna Cecília Benazzato.

Caberá às pesquisadoras elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: ww2.icb.usp.br/icb/cepsb, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto. O primeiro relatório deverá ser enviado, via Plataforma Brasil, até **22/08/2019**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BENAZZATO, Cecília

Título: **Modelagem celular de bebês nascidos com microcefalia causada por infecção vertical por Zika Vírus**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Vó Catharina, Vó Geny e Vô Paulucci, aos meus pais, José Antonio e Ana Clara, e ao meu marido, Philipe, por toda paciência e dedicação com essa pessoa que aqui vos escreve. O apoio e amor de vocês foi essencial para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Prof.^a Patricia Beltrão Braga** por ser minha base, seja ela de conhecimento, seja de papos aleatórios de Star Wars. Obrigada por toda paciência, conselhos, noites em claro na correria de entrega, pelas caminhadas, dietas (até isso, Paty!), e por me ensinar e mostrar o que é a verdadeira Ciência. Obrigada por me aceitar como sua orientanda e por me permitir realizar meu sonho. Obrigada por ser minha Obi-Wan Kenobi e me permitir ser “seu Luke”.

À **Graciela Pignatari** por responder aquela primeira mensagem e me permitir conhecer o laboratório e, com isso, confirmar que minha alma está ligada a Ciência. Obrigada por sempre me receber de braços abertos e por sempre trazer sua alegria em meu coração. Obrigada do fundo do coração!

Às amigas de laboratório **Anita, Ariane, Andrelixa, Gabriela, Giovanna e Tamires** por todo suporte e por participarem da minha vida nesse momento tão único. Sou grata a cada momento com vocês. Em especial a **Fabiele**, que se tornou minha irmã mais velha nessa família tão bonita. Obrigada por ter tanta paciência e por sempre me ajudar! Obrigada por tudo!

Aos queridos **Dr. Fernando Henrique Lojudice e Dr. Paulo Emílio Corrêa Leite** por toda ajuda em vários processos desse trabalho. Vocês me ajudaram muito! Muito obrigada!

À **Dra. Patrícia Jungmann** e a **Dra. Vanessa van der Linden** por nos ajudar com a obtenção das amostras e anamnese dos pacientes presentes neste estudo.

Às **mães e bebês** que participaram desse projeto tão grande e que estão ajudando a trazer esperança para muitas outras crianças. Sem vocês, esse estudo não seria possível.

À minha família, que me apoiou em todas as decisões e esteve presente em todos os momentos da minha vida. Sem vocês, eu jamais estaria onde estou hoje. Ao meu pai **José**, que desde cedo me incentivou a estudar e me permitiu ter o primeiro contato com a Ciência com kits básicos de Química e um microscópio que guardo até hoje. À minha mãe **Ana**, que sempre fez o possível e o impossível para permitir que eu pudesse estar aqui hoje e sempre me incentivou a cuidar de mim mesma e dos meus estudos. E à minha irmã **Carolina**, pelas risadas, bobagens e até mesmo, as brigas. Porque um irmão é metade de nós mesmos: sem ele somos pouco e com ele, temos o mundo na palma da mão! MUITÍSSIMO obrigada!

Ao **Philippe Suman**, meu porto seguro. Obrigada por me ceder além de um ombro, mas ceder seu coração e alma em todos os momentos de nossas vidas. Obrigada por sempre respeitar minhas decisões, por estar presente nos momentos mais importantes da minha vida e por me trazer segurança, sempre.

Aos meus amigos que sempre me apoiam, me dão ombro, me aguentam em situações de estresse com abraços, e respeitam e entendem todos os meus momentos de ausência. Vocês são maravilhosos! Muito obrigada por cada torcida de vocês!

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo** e ao **Instituto de Ciências Biomédicas** por terem sido minha casa, e por permitir que a obtenção desse título seja possível.

À **Prof.^a Dr.^a Maria Angélica Miglino** e **Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior** por abrirem as portas do departamento e, assim, ter-me possibilitado um contato tão único e verdadeiro com a Ciência.

A todos os professores e funcionários da FMVZ/USP, que estão sempre dispostos e solícitos em todos os momentos, e por todos os ensinamentos passados ao longo desses anos.

Ao **CNPq** (169784/2017-7) pelo apoio financeiro durante esses quase cinco anos de doutorado.

“

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

- Leonardo da Vinci

RESUMO

BENAZZATO, C. **Modelagem celular de bebês nascidos com microcefalia causada por infecção vertical por Zika Vírus**. 2021. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Em 2015, um número incomum de casos de bebês nascidos com microcefalia no Nordeste do Brasil chamou atenção, especialmente por apontarem um arbovírus, o Zika vírus (ZIKV), como possível causador de uma infecção congênita. O ZIKV é um Flavivírus transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti* e cuja infecção produz efeitos brandos em humanos, com raras manifestações neurológicas e ocasionalmente síndrome de Guillain-Barré. Entretanto, em função de esclarecer os casos de microcefalia, estudos foram realizados comprovando que o ZIKV era capaz de infectar células do Sistema Nervoso Central (SNC), como neurônios e células da glia e, em especial, células mais imaturas, como as progenitoras neurais (NPC), abundantes no feto. Quando as NPC são infectadas pelo ZIKV, há menos migração celular, comprometimento da neurogênese e morte celular por apoptose, o que provavelmente acaba contribuindo para a microcefalia em recém-nascidos. O intuito desse projeto foi o de modelar in vitro o SNC de pacientes que nasceram com microcefalia congênita causada pela infecção vertical por ZIKV. Nosso objetivo foi verificar os efeitos celulares e moleculares da ação do vírus nestes pacientes durante a formação do SNC sob a hipótese de que a infecção maternal tenha induzido modificações celulares e moleculares que sejam responsáveis pelo fenótipo patogênico apresentado na síndrome congênita do Zika vírus (CZS). Nossos resultados mostraram que os fibroblastos utilizados para a reprogramação e estudo desses pacientes in vitro foi uma ótima alternativa mediante a dificuldade de obtenção de amostras. Além disso, as iPSC geradas através da reprogramação via transfecção de plasmídeos episomais nos fibroblastos foram diferenciadas em astrócitos e neurônios. De acordo com a porcentagem de células diferenciadas, os pacientes foram divididos em dois grupos: um com 20% de astrócitos na cultura mista de neurônios (CZS-A), semelhante ao grupo controle, e outro grupo que apresentou baixa expressão de marcadores de astrócitos (CZS-B). A investigação da quantidade de sinapses nos neurônios derivados das iPSC dos pacientes com a CZS apresentavam menor expressão nas proteínas pré e pós-sinápticas (em ambos os grupos), assim como na sua

colocalização, indicando que esses pacientes apresentam uma redução significativa de sinapses comparado ao grupo controle. Entretanto, foi observado uma redução significativa de proteína pós-sináptica e sua colocalização com a proteína pré-sináptica ao comparar os dois grupos de neurônios, sendo menor em pacientes CZS-B. Um quadro de redução significativa na produção de glutamato também foi observado nos astrócitos dos pacientes com CZS em comparação ao grupo controle, porém a curva de recaptação de glutamato apresentou o mesmo padrão de recaptação em ambos os grupos. Com esse trabalho e os resultados obtidos, podemos dizer que é possível modelar a CZS in vitro focando nos fenótipos celulares e moleculares, porém mais estudos serão necessários para confirmar esses achados e eventualmente correlacioná-los com as características clínicas encontradas nestas crianças.

Palavras-chave: Zika Vírus, Microcefalia, iPSC, Modelagem de doenças, SNC

ABSTRACT

BENAZZATO, C. **Título em inglês:** subtítulo, se houver. [Cellular modeling of babies born with microcephaly caused by vertical infection by Zika Virus]. 2021. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

In 2015, an unusual number of cases of babies born with microcephaly in Northeastern Brazil drew attention, especially for pointing out an arbovirus, the Zika virus (ZIKV), as a possible cause of congenital infection. ZIKV is a flavivirus transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito and whose infection produces mild effects in humans, with rare neurological manifestations and occasionally Guillain-Barré syndrome. However, to clarify the microcephaly cases, studies have been carried out proving that ZIKV was able to infect cells of the Central Nervous System (CNS), such as neurons and glial cells and, in particular, more immature cells, such as neural progenitors. (NPC), abundant in the fetus. When NPCs are infected with ZIKV, there is less cell migration, impaired neurogenesis, and cell death from apoptosis, which probably contributes to microcephaly in newborns. The aim of this project was to model in vitro the CNS of patients who were born with congenital microcephaly caused by vertical ZIKV infection. Our objective was to verify the cellular and molecular effects of the virus action in these patients during the CNS formation under the hypothesis that maternal infection has induced cellular and molecular changes responsible for the pathogenic phenotype presented in the congenital Zika virus syndrome (CZS). Our results showed that the fibroblasts used for reprogramming and studying these patients in vitro were a great alternative due to the difficulty of obtaining samples. Also, iPSCs generated by reprogramming via transfection of episomal plasmids in fibroblasts were differentiated into astrocytes and neurons. According to the percentage of differentiated cells, patients were divided into two groups: one with 20% of astrocytes in the mixed neuron culture (CZS-A), similar to the control group, and another group that presented low expression of astrocyte markers. (CZS-B). The investigation of the number of synapses in the iPSC-derived neurons of patients with CZS showed less expression in pre-and postsynaptic proteins (in both groups), as well as in their colocalization, indicating that these patients have a significant reduction in synapses compared to the control group. However, a significant reduction in postsynaptic protein and its colocalization with presynaptic protein was observed when comparing the two groups

of neurons, lower CZS-B patients. A picture of a significant reduction in glutamate production was also observed in the astrocytes of patients with CZS compared to the control group. Still, the glutamate reuptake curve showed the same reuptake pattern in both groups. With this work and the results obtained, we can say that it is possible to model CZS in vitro, focusing on cellular and molecular phenotypes. However, more studies will be needed to confirm these findings and eventually correlate them with the clinical characteristics found in these children.

Keywords: Zika Virus, Microcephaly, iPSC, Disease modeling, CNS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do Zika vírus.....	29
Figura 2 - Linha do tempo da infecção do Zika vírus	31
Figura 3 – Esquema representativo do protocolo utilizado para a reprogramação de fibroblastos para iPSCs.....	42
Figura 4 – Foto representativa de microscopia de luz de fibroblastos de pele de pacientes com CZS	55
Figura 5 - PCR para identificação de micoplasma	58
Figura 6 – Fotomicrografia em luz branca representativa das fases de reprogramação celular de fibroblastos em iPSC	59
Figura 7 – Fotomicrografia em luz branca representativa da morfologia das colônias de iPSC	60
Figura 8 – Caracterização das iPSC obtidas a partir de fibroblastos reprogramados de pacientes que nasceram com a síndrome congênita do Zika vírus	62
Figura 9 – Fotomicrografias de microscopia de luz representativas das células de pacientes que nasceram com a CZS, e controles, utilizadas neste trabalho, mostrando as etapas desde os fibroblastos até as NPC	64
Figura 10 – Caracterização de células progenitoras neurais obtidas a partir de fibroblastos reprogramados de pacientes que nasceram com a síndrome congênita do Zika vírus	65
Figura 11 – Fotomicrografias de microscopia de luz representativas das células de pacientes que nasceram com a CZS, e controles, utilizadas neste trabalho, mostrando as etapas desde as NPC até diferenciação neuronal	66
Figura 12 – Caracterização de neurônios obtidos a partir de fibroblastos reprogramados de pacientes CZS e controles.....	67
Figura 13 – Fotomicrografias de microscopia de luz representativas das células de pacientes que nasceram com a CZS, e controles, utilizadas neste trabalho, mostrando as etapas desde as NPC até diferenciação para astrócitos.....	73
Figura 14 – Caracterização de astrócitos obtidos a partir de fibroblastos reprogramados de pacientes que nasceram com CZS e controles	74
Figura 15 – Quantificação das sinapses dos neurônios obtidos a partir de fibroblastos reprogramados de pacientes que nasceram com CZS e controles	77
Figura 16 – Esquema representativo do ciclo Glutamato - Glutamina.....	79

Figura 17 – Análise de glutamato do sobrenadante de astrócitos e neurônios obtidos a partir de fibroblastos reprogramados de pacientes que nasceram com a síndrome congênita do Zika vírus	81
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Parâmetros utilizados na eletroporação de fibroblastos	43
Quadro 2 -	Anticorpos utilizados para caracterização celular	47
Quadro 3 -	Oligonucleotídeos utilizados para a caracterização celular por PCR em tempo real (qPCR)	48
Quadro 4 -	Anticorpos utilizados para quantificação de sinapses dos neurônios gerados a partir das células tronco pluripotentes induzidas derivadas de fibroblastos de pacientes portadores da síndrome congênita do Zika vírus.....	49
Quadro 5 -	Total de amostras recebidas para o estudo “Modelagem celular de bebês nascidos com microcefalia causada por infecção vertical por Zika vírus” de março de 2017 até abril de 2018 contendo informações gerais sobre os pacientes.	52
Quadro 6 -	Anamnese dos pacientes que enviaram amostras para o estudo “Modelagem celular de bebês nascidos com microcefalia causada por infecção vertical por Zika vírus” de março de 2017 até abril de 2018 com dados clínicos	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGM	do inglês " <i>Astrocyte Growth Medium</i> "
b-FGF2	do inglês " <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> " e do português "Fator de crescimento de fibroblasto"
BSA	do inglês " <i>Bovine Serum Albumin</i> " e do português "Albumina Sérica Bovina"
CCL5-RANTES	do inglês " <i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i> " e do português "Ligante 5 de quimiocina CC"
cDNA	do inglês " <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> " e do português "Ácido desoxirribonucleico complementar"
c-Myc	do inglês " <i>Myc proto-oncogene protein</i> " e do português "proteína proto-oncogênica Myc"
CO ₂	Dióxido de carbono
CTRL	Paciente Controle
CXCL10/IP-10	do inglês " <i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i> " ou " <i>human interferon-inducible protein 10</i> " e do português "ligante 10 de quimiocina com motivo C-X-C" ou "proteína 10 induzida por interferon gama"
CZS	do inglês " <i>Congenital Zika Syndrome</i> " e do português "Síndrome Congênita do Zika vírus"
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DMEM	do inglês " <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> "
EB	do inglês " <i>Embryonic Body</i> " e do português "Corpo embrióide"
ELA	Esclerose lateral amiotrófica

ELISA	do inglês “ <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ” e do português “Ensaio de imunoabsorção enzimática”
FDA	do inglês “ <i>Food and Drug Administration</i> ”
GABA	do inglês “ <i>Gamma-AminoButyric Acid</i> ” e do português “Ácido gama-aminobutírico”
GAPDH	do inglês “ <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i> ” e do português “Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase”
G-CSF	do inglês “ <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> ” e do português “Fator estimulador de colônias granulocitárias”
GFAP	do inglês “ <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> ” e do português “Proteína glial fibrilar ácida”
GM-CSF	do inglês “ <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> ” e do português “Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos”
HCV	Virus da Hepatite C
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iPSC	do inglês “ <i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> ” e do português “Célula-Tronco Pluripotente Induzida”
kB	Quilobyte
Klf4	do inglês “ <i>Kruppel-like factor 4</i> ”
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MAP2	do inglês “ <i>Microtubule-associated protein 2</i> ” e do português “Proteína associada a microtúbulos”
MCP-1	do inglês “ <i>Deregulated monocyte chemoattractant protein-1</i> ” e do português “O ligando 2 da quimiocina”

mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ms	Milissegundo
MS1	Musashi 1
Nanog	do inglês “ <i>nanog homeobox</i> ”
NB	Meio de crescimento neural, contendo os suplementos N2 e B27
NBF	Meio de crescimento neural, contendo os suplementos N2, B27 e b-FGF2
ng	Nanograma
NPC	do inglês “ <i>Neural progenitor cell</i> ” e do português “Célula progenitora neural”
Oct3/4	do inglês “ <i>Octamer 4</i> ”
OMS	Organização mundial da saúde
ORF	do inglês “ <i>Open reading frame</i> ” e do português “Fase de leitura aberta”
PBS	do inglês “ <i>Phosphate Buffered Saline</i> ” e do português “Tampão salina-fosfato”
PCR	do inglês “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ” e do português “Reação em cadeia da polimerase”
PDGF-BB	do inglês “ <i>Platelet-derived growth factor BB</i> ” e do português “Fator de crescimento derivado de plaquetas”

PSD95	do inglês “ <i>Postsynaptic density protein 95</i> ” e do português “proteína de densidade pós-sináptica 95”
PZ	Paciente com CZS
qPCR	do inglês “ <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> ” e do português “Reação quantitativa em cadeia de polimerase”
RNA	do inglês “ <i>Ribonucleic Acid</i> ” e do português “Ácido Ribonucleico”
rpm	Rotações por minuto
S100B	do inglês “ <i>S1000 Calcium Binding Protein B</i> ” e do português “Proteína B de ligação ao cálcio S100”
SNC	Sistema Nervoso Central
Sox2	do inglês “ <i>SYR (sex determining region Y) – box2</i> ”
SYN1	Sinapsina 1
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEA	Transtorno do Espectro do Autismo
TNF- α	do inglês “ <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> ” e do português “Fatores de Necrose Tumoral Alfa”
UTR	do inglês “ <i>Untranslated region</i> ” e do português “Região não codificante”
V	Volt
VEGF	do inglês “ <i>Vascular endothelial growth fator</i> ” e do português “Fator de crescimento endotelial vascular”
ZIKV	Zika Vírus

ZIKV ^{AF}	Cepa africana do Zika vírus
--------------------	-----------------------------

ZIKV ^{BR}	Cepa brasileira do Zika vírus
--------------------	-------------------------------

µg	Micrograma
----	------------

µM	Micromolar
----	------------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	28
	2.1 O ZIKA VÍRUS	28
	2.1.1 Síndrome Congênita do Zika Vírus (CZS).....	32
	2.2 MODELAGEM DE DOENÇAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)	37
3	OBJETIVOS	40
	2.1 Objetivos Gerais	40
	2.2 Objetivos Específicos	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
	4.1 COLETA E CULTIVO DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DE BIÓPSIA DA EPIDERME.....	41
	4.2 REPROGRAMAÇÃO CELULAR DE FIBROBLASTOS PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS A PARTIR DA TRANSFEÇÃO COM PLASMÍDEOS EPISSOMAIS	42
	4.2.1 Cultivo e expansão das células-tronco pluripotente induzidas (iPSC)	43
	4.3 PRODUÇÃO DE NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS DERIVADAS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VIRUS E CONTROLES	44
	4.3.1 Produção de corpos embrióides.....	44
	4.3.2 Produção de rosetas e células progenitoras neurais (NPC)	44
	4.3.3 Produção de neurônios a partir de iPSC de pacientes portadores da síndrome congênita do Zika vírus e controles	45
	4.3.4 Produção de astrócitos a partir de iPSC de pacientes portadores da síndrome congênita do Zika vírus e controles	45
	4.4 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS GERADAS.....	46
	4.4.1 Análise Morfológica	46
	4.4.2 Análise Fenotípica das Células (Imunofluorescência)	46
	4.4.3 Extração de RNA e produção de cDNA	47
	4.4.4 Análise Molecular por PCR quantitativo (qPCR).....	47
	4.4.5 Análise de Glutamato	48
	4.4.6 Quantificação de sinapses	48
	4.4.7 Detecção e quantificação de citocinas em astrócitos e neurônios.....	49
5	RESULTADOS	50

5.1 ANAMNESE DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS E CONTROLES.....	50
5.2 CULTIVO CELULAR DOS FIBROBLASTOS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS.....	54
5.3 TRANSFEÇÃO DOS FIBROBLASTOS E GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS DE PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS	56
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPsc) DERIVADAS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS.....	61
5.5 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS DERIVADAS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS	63
5.6 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NEURÔNIOS DERIVADOS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS E CONTROLES	66
5.6 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ASTRÓCITOS DERIVADOS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS E CONTROLES	72
5.8 QUANTIFICAÇÃO DE SINAPSES EM NEURÔNIOS DERIVADOS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS E CONTROLES	76
5.9 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GLUTAMATO EXTRACELULAR EM CULTURA DE ASTRÓCITOS E DE NEURÔNIOS DERIVADOS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS E CONTROLES.....	79
5.10 ANÁLISE DE CITOCINAS DE ASTRÓCITOS E NEURÔNIOS DERIVADOS DE PACIENTES COM MICROCEFALIA PELA INFECÇÃO DO ZIKV	82
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS.....	92
ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

O Zika Vírus (ZIKV), um arbovírus pertencente à família Flaviviridae, por muito tempo esteve associado apenas a manifestações brandas em humanos, causando febre baixa, *rash* cutâneo, artralgia e conjuntivite (LANCIOTTI et al., 2008). Entretanto, em 2015, um número incomum de casos de bebês nascidos com microcefalia no Nordeste do Brasil, chamou a atenção para um quadro de infecção congênita, cujas características que mais chamavam a atenção foram a microcefalia e anormalidades neurológicas, incluindo malformações corticais graves, ventriculomegalia, hipoplasia cerebelar e hipodensidade anormal da substância branca (ARAGAO et al., 2016; HAZIN et al., 2016; MELO et al., 2016; SOUSA et al., 2016). Na época, houve grande mobilização dos médicos e cientistas para provar a associação direta do vírus com a chamada Síndrome Congênita do Zika vírus (do inglês, *Congenital Zika Syndrome*, CZS) (FRANÇA et al. 2016, OLIVEIRA et al, 2016; VAN DER LINDEN et al, 2016).

Dentre os trabalhos pioneiros na tentativa de elucidar a relação direta do ZIKV e a microcefalia, podemos citar o trabalho que mostrou que a cepa do ZIKV circulante no Brasil foi encontrada na placenta e no líquido amniótico de duas mulheres grávidas e no sangue dos respectivos recém-nascidos, sugerindo fortemente o vírus podia atravessar a membrana placentária (CALVET et al.; 2016). Posteriormente, o vírus também foi localizado no cérebro e na retina dos fetos com microcefalia (KIM et al.; 2017). Entretanto, a prova definitiva da ligação do ZIKV com a microcefalia veio com estudos em modelos *in vitro* e *in vivo*, livres de quaisquer outros patógenos, que mostraram que o ZIKV tinha tropismo por células do sistema nervoso central (SNC) e infectava os filhotes de camundongos fêmeas grávidas (CUGOLA et al., 2016). Esses mesmos modelos também foram posteriormente utilizados investigação dos mecanismos de patogênese viral, fornecendo informações fundamentais para estratégias de combate ao vírus e às sequelas da infecção (MESCI et al., 2018).

Interessante mencionar que há relatos de que 20% dos casos de CZS podem apresentar um perímetro cefálico normal (FRANÇA et al., 2016). Em tempo, um outro ponto interessante foi proposto por outro estudo realizado com gêmeos discordantes, que sugere que a CZS não é um evento estocástico, mas sim dependente da suscetibilidade intrínseca das células progenitoras neurais (do inglês, Neural Progenitor Cells), onde provavelmente há um papel da genética e epigenética relacionados (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018).

Além da microcefalia e alterações neurológicas mencionadas, os bebês com CZS apresentam irritabilidade, hiperexcitabilidade, choro excessivo, distúrbios de deglutição, além de comprometimento nas respostas auditivas e visuais. Existem relatos de crises convulsivas já no período neonatal, seguido de crises epiléticas a partir dos três meses de idade. Também foram identificadas deformidades ósseas, pés tortos congênitos e anormalidades oculares (EICKMANN et al., 2016). Interessante pontuar que ainda não sabemos como será a evolução clínica destas crianças nascidas com a CZS, pois atualmente ainda estão se desenvolvendo, com cerca de 4-5 anos de idade. Um estudo realizado com 216 bebês portadoras da CZS revelou que as crianças com CZS apresentaram um neurodesenvolvimento abaixo da média e / ou avaliações oculares ou auditivas anormais em 31,5% das crianças entre 7 e 32 meses de idade (NIELSEN-SAINES et al., 2019). A função da linguagem foi a mais afetada, com 35% de 146 crianças abaixo da média. Resultados de melhora no desenvolvimento neurológico foram observados em crianças do sexo feminino, bebês a termo, crianças com exames de vista normais e infecção materna mais tardias na gravidez. Também foi observado resolução da microcefalia com neurodesenvolvimento normal em duas de oito crianças, desenvolvimento de microcefalia secundária em duas outras crianças e transtorno do espectro do autismo (TEA) em três crianças previamente saudáveis no segundo ano de vida (NIELSEN-SAINES et al., 2019).

Em relação ao tratamento ou prevenção da infecção congênita, estudos avançaram recentemente, trazendo dados de que o sofosbuvir, um antiviral aprovado pelo FDA para o tratamento de Hepatite C, é eficiente e capaz de inibir a replicação do ZIKV in vitro e in vivo (KRISTEN et al., 2017; MESCI et al., 2018). Outros estudos in vitro analisaram drogas como a Hesperetina, Hesperidina como inibidores das proteases do Zika vírus e Chikungunya (EBERLE et al., 2021), e a cloroquina (DELVECCHIO et al., 2016), revelando que essas seriam drogas potenciais para o tratamento da infecção pelo ZIKV. Apesar desses estudos, ainda não há consenso de qual deveria ser o tratamento preventivo da CZS em mulheres grávidas.

Neste projeto, nosso intuito foi o de modelar o Sistema Nervoso Central (SNC) de crianças nascidas com a CZS, a fim de verificar os danos que poderiam estar presentes neste sistema, a fim de contribuir com o entendimento da patogenicidade do Zika e seu comprometimento para o neurodesenvolvimento. Para tanto, fibroblastos de bebês que nasceram com microcefalia por conta da infecção vertical

por ZIKV foram coletados e reprogramados em células pluripotentes induzidas (do inglês, *induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC) e a partir destas, foram produzidas células do SNC como células progenitoras neurais (do inglês *neuroprogenitor cells*, NPC), neurônios e astrócitos em sistemas 2D de cultura celular, com o objetivo de analisar os fenótipos das células do SNC de pessoas afetadas pela CZS. Nossa hipótese é que a infecção durante a neurogênese no feto é capaz de causar alterações que podem impactar de forma significativa as células do SNC causando prejuízos permanentes ao seu funcionamento, sejam pela infecção *per se*, pela resposta imunológica da mãe ou do feto, possivelmente causando alterações permanentes via mudanças epigenéticas.

Por fim, interessante salientar que apesar de não ser um objetivo deste projeto, a metodologia utilizada neste trabalho proporciona a criação de uma plataforma celular para buscar novas estratégias terapêuticas para os pacientes, como já foi utilizado anteriormente com modelos infectados *in vitro* (MESCI et al., 2018).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ZIKA VÍRUS

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivírus* (família *Flaviviridae*), cuja estrutura se assemelha a de outras espécies de *Flavivírus* (SIROHI et al., 2016). O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 na floresta de Zika, situada nas proximidades de Entebbe, em Uganda, após ser isolado no soro de um macaco Rhesus infectado (DICK et al., 1952). A primeira amostra em que o ZIKV foi isolado foi coletada em 1947, e um segundo isolamento do vírus foi realizado em 1948, quando o vírus foi isolado de uma piscina de mosquitos *Aedes africanus* coletados na mesma floresta (DICK et al., 1952). A primeira infecção em humanos foi descrita em 1954, contando com três casos na Nigéria (Figura 1) (MACNAMARA, 1954).

A estrutura do ZIKV constitui de envelope, capsídeo e genoma viral. O envelope viral é constituído por uma bicamada lipídica tipo I com Glicoproteínas E e M associadas, assim criando interação entre o vírus e o receptor da célula alvo (PERERA-LECOIN et al., 2013). O genoma do ZIKV consiste em 10.794 nucleotídeos (10.8kb) em uma única fita de RNA simples, de polaridade positiva, que codificam 3.422 aminoácidos. Esta fita de RNA contempla uma região 5' não traduzida (UTR, do inglês *Untranslated region*) (~107 nucleotídeos), uma única sequência de leitura aberta (ORF, do inglês *Open reading frame*) (~10.2kb) e um UTR 3' (~420 nucleotídeos) (KUNO et al., 2007). O ORF é capaz de codificar três proteínas estruturais; proteína de capsídeo (C), pré-proteína de membrana/proteína de membrana (prM/M) e proteína de envelope (E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura do Zika vírus

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: O Zika vírus é constituído por envelope, capsídeo, proteína de membrana e uma fita simples de RNA com polaridade positiva. O RNA é formado por 3422 aminoácidos, sendo divididos em 3 proteínas estruturais e 7 proteínas não estruturais. aa – Aminoácidos

Em relação a transmissão, muitos vírus dessa família são transmitidos através da picada de mosquitos e por isso são considerados arbovírus (*Arthropod Borne Viruses*) (BLÁZQUEZ et al., 2014). No início, acreditava-se que o ZIKV era apenas transmitido através de picadas de mosquito do gênero *Aedes*. Porém, estudos mostraram que o potencial de vetores é variável e de acordo com a região geográfica, a espécie do gênero *Aedes* pode ser diferente (BAUD et al., 2017; DIALLO et al., 2014; MARCONDES et al., 2015), com isso aumentando a possibilidade do ZIKV se espalhar por outras regiões cujos vetores estão presentes. Importante salientar que o ZIKV pode ser transmitido por mosquitos infectados em um habitat silvestre para macacos rhesus e vice-versa, em um ciclo enzoótico entre primatas não humanos. O vetor deste mosquito infectado, portanto, infecta humanos neste habitat após uma picada de mosquito ou um mosquito de propagação dos habitats silvestres para áreas rurais ou urbanas em um ciclo epidêmico. Além disso, um ciclo epidêmico geralmente começa quando os humanos são infectados pelos mosquitos infectados após a viremia e a replicação viral, enquanto o vírus se espalha para as áreas reprodutivas humanas e, portanto, o ciclo continua. Até o momento, não se sabe se o ZIKV pode ser transmitido por mosquitos entre animais domésticos e se o ZIKV também pode ser

transmitido sexualmente entre primatas não humanos (macacos), (Basu e Tumban, 2016).

Além disso, partículas ativas do ZIKV foram encontradas em amostras de saliva, urina (SILVA et al., 2016; DU et al., 2019) e sêmen (MANSUY et al., 2016), indicando ser possível a transmissão do ZIKV sem a necessidade de um vetor. Há casos reportados de transmissão sexual, onde o homem esteve em região endêmica, e transmitiu o ZIKV para sua parceira após manter relações sexuais (HARROWER et al., 2016; FRÉOUR et al., 2016; FRANK et al., 2016). Além disso, estudos in vivo e in vitro verificaram que o vírus é capaz de se replicar em células do tecido testicular humano, infectando diversos tipos celulares encontrados na região, incluindo células germinativas, comprovando a infecção do ZIKV por via sexual (MATUSALI et al., 2018). Existem relatos de que a transmissão sexual ocorreu até 44 dias após o início dos sintomas; partículas virais infecciosas foram isoladas até 69 dias após o início dos sintomas no sêmen e até 2 dias após o início dos sintomas no trato genital feminino (MOREIRA et al., 2017; PENOT et al., 2017).

Na década de 1950, casos esporádicos de infecção por ZIKV foram reportados na África e Ásia (HENRY, 2014). Em 2007, foi reportada uma epidemia por ZIKV na Ilha Yap, Micronésia, onde estima-se que pelo menos 73% da população tenha sido exposta ao vírus (DUFFY et al., 2009). Anos depois, em outubro de 2013, os primeiros casos foram documentados na Polinésia Francesa, Oceania, resultando em um surto onde estima-se que 11% da população tenha sido infectada pelo vírus (CAO-LORMEAU et al., 2013). Apesar da maioria dos casos de infecção por ZIKV serem subclínicos, o cenário clínico clássico se assemelha ao de outros vírus, como o da Dengue e do Chikungunya, dificultando o diagnóstico diferencial. Os sinais de infecção são febre baixa, dor de cabeça, artralgia, mialgia, exantema e conjuntivite não purulenta (CHANG et al., 2016). Casos de síndrome de Guillain-Barré foram descritos em adultos (ARAUJO et al., 2016; CAO-LORMEAU et al., 2016; MUÑOZ et al., 2016). O vírus foi introduzido no Brasil entre 2013 e 2015, provavelmente do Pacífico e causou uma grande epidemia que atingiu o pico em novembro de 2015 (BAUD et al., 2017). No Brasil, os primeiros 45 casos de infecção foram reportados em fevereiro de 2016, no município de Caxias, no estado do Maranhão, Brasil. Os pacientes apresentaram febre, exantema e dores de cabeça. Em abril do mesmo ano, 10.155 casos de infecção foram reportados nos estados da Bahia, Maranhão, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe, Piauí, Ceará, Alagoas e Paraíba. Em 2016, o número

de casos de infecção reportados subiu para 72.289 na mesma região. (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Ainda no Brasil foram descritos os primeiros casos de microcefalia pela infecção vertical do ZIKV em bebês, culminando na descrição de uma nova Síndrome de Congênita do Zika vírus (CZS), sendo a microcefalia um dos seus sinais clínicos observados ao nascimento (ARAGAO et al., 2016; MLAKAR et al., 2016).

Figura 2 - Linha do tempo da infecção do Zika vírus

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: Linha do tempo desde o primeiro isolamento do ZIKV, na Floresta de Zika em 1947, a primeira infecção em humanos em 1954 e a demais anos e rota de circulação do ZIKV até a sua chegada no Brasil, em 2015.

Atualmente, 87 países e territórios registraram transmissão autóctone do ZIKV por mosquitos até julho de 2019 e distribuídos em quatro das seis regiões da OMS: África, Américas, Sudeste Asiático e regiões do Pacífico Ocidental (WHO, 2019; WHOa, 2019), com a Etiópia como o único novo país adicionado à lista (MENGESHA TSEGAYE et al., 2018). Os surtos de infecção pelo ZIKV atingiram o pico em 2016 e diminuíram substancialmente ao longo de 2017 e 2018 na região das Américas (WHOc, 2018), no entanto, o Chile continental, Uruguai e Canadá não relataram nenhuma transmissão do ZIKV até o momento (WHO, 2018). A OMS relatou que sessenta e um países e territórios nas regiões da OMS, globalmente, têm evidências de vetores do mosquito *Aedes aegypti* competentes e, no entanto, ainda não

documentaram qualquer transmissão do ZIKV (WHOa, 2019). Existe, portanto, o risco provável de o ZIKV se espalhar para mais países. O ZIKV está atualmente dominando as Américas, a Região Africana, a Região do Sudeste Asiático e a Região do Pacífico Ocidental dentre as seis Regiões da OMS (WHO, 2019; WHOa, 2019). O estado atual de transmissão e disseminação do ZIKV é, no entanto, uma ameaça global à saúde e, pelo que foi mencionado, tem o potencial de ressurgir como uma epidemia.

2.1.1 Síndrome Congênita do Zika Vírus (CZS)

Em novembro de 2015, uma epidemia de microcefalia passou a ser reportada no Brasil. A primeira evidência forte da associação da microcefalia causada pelo ZIKV foi oferecida a partir da necropsia de um feto que apresentou microcefalia na 29ª semana de gestação, onde além de diversas malformações cerebrais e PCR positivo para ZIKV, partículas virais foram observadas no cérebro (MLAKAR et al., 2016). Entretanto, como a relação causal direta não poderia ser comprovada até que se tivesse um modelo controlado, totalmente livre da presença de outros patógenos que também podem ser associados a microcefalia. A associação só pode ser confirmada após testes em camundongos que provaram que o ZIKV é capaz de atravessar a placenta de fêmeas de camundongo, fazendo com que os filhotes nascessem miúdos e com menos da metade do peso ideal, além do tamanho do cérebro ser melhor do que o de filhotes saudáveis (CUGOLA et al., 2016). O mesmo estudo também comprovou, em neuroesferas e minicérebros produzidos in vitro, que a cepa brasileira causava morte celular mais acentuada em células precursoras neurais (NPC), que são células em abundância nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (CUGOLA et al., 2016). Além disso, os autores estavam interessados em entender por que o ZIKV isolado a tanto tempo na África nunca tinha sido reportado como causador da CZS. Para tanto, infectaram neuroesferas e minicérebros com a cepa brasileira (ZIKV^{BR}) e com a cepa africana (ZIKV^{AF}) e após o quarto dia da infecção, as neuroesferas infectadas pelo ZIKV^{BR} estavam visivelmente menores do que aquelas infectadas com ZIKV^{AF}, revelando que a cepa brasileira aparentemente tinha um potencial de agressividade no SNC exacerbado em relação a Africana. As alterações no tamanho e estrutura comprovaram que houve apoptose e autofagia das células e ainda que o ZIKV^{BR} impedia a migração das NPC, processo que provavelmente contribui para a redução da espessura do córtex cerebral. Na mesma época, outros

trabalhos usando tecnologia semelhante também mostraram que o Zika era capaz de infectar células neurais humanas in vitro, porém esses trabalhos haviam usado apenas a cepa Africana (Tang et al., 2016; Garcez et al., 2016).

A associação temporal entre o surto de ZIKV e malformações congênitas graves do SNC também foi relatada em uma análise retrospectiva realizada na Polinésia Francesa. Em comparação com pessoas não infectadas, a taxa de risco de desenvolver anomalias cerebrais foi de aproximadamente 50% na Polinésia Francesa e Recife, Brasil (ARAÚJO et al, 2016; CAUCHEMEZ et al, 2016).

Importante salientar que as características clínicas dos recém-nascidos com microcefalia por ZIKV mostraram diferenças entre aqueles que nasceram com microcefalia resultante de toxoplasmose, sífilis, rubéola, citomegalovírus e herpes congênito. No caso da CZS, as características clínicas incluíam circunferência cefálica igual ou abaixo de 31,9 centímetros para meninos, e igual ou abaixo de 31,5 centímetros para meninas e anormalidades neurológicas, incluindo malformações corticais graves, ventriculomegalia, hipoplasia cerebelar e hipodensidade anormal da substância branca (ARAGAO et al., 2016; HAZIN et al., 2016; MELO et al., 2016; SOUSA et al., 2016). Como mencionado anteriormente, nem sempre a microcefalia é observada, com cerca de 20% dos pacientes apresentando um perímetro cefálico normal ao nascimento (FRANÇA et al., 2016). Por conta dessa observação, o rastreamento de microcefalia no nascimento não é suficiente para detectar a CZS (EPPES et al., 2017). A desaceleração do crescimento da cabeça foi relatada em bebês nascidos com perímetro cefálico normal, levando ao desenvolvimento de microcefalia após o nascimento (VAN DER LINDEN et al., 2016). Desproporção craniofacial com a testa inclinada, devido à hipoplasia do lobo frontal, é típico em casos graves e pode ocorrer na ausência da microcefalia. As calcificações intracranianas são mais comuns na junção da substância branca e cinzenta, mas pode ocorrer na substância branca periventricular, nos gânglios da base e/ou no tálamo (VAN DER LINDEN et al., 2016). Em casos graves, o colapso do crânio pode ser evidente com sobreposição de suturas e aumento de dobras cutâneas. Contraturas congênitas podem ocorrer em associação com hipoplasia do tronco encefálico e estreitamento de toda medula espinhal (ARAGAO et al., 2016). Os bebês com CZS também apresentam irritabilidade, hiperexcitabilidade, choro excessivo, distúrbios de deglutição, e comprometimento nas respostas auditivas e visuais. Existem relatos de crises convulsivas já no período neonatal, seguido de crises epiléticas a partir dos

três meses de idade. Também foram identificadas deformidades ósseas, pés tortos congênitos e anormalidades oculares (EICKMANN et al., 2016). Esse espectro de achados clínicos caracterizam a CZS. Um dado curioso que tem chamado atenção nos casos de microcefalia por infecção vertical por ZIKV é a longa persistência viral na mãe e no feto (SILVA et al., 2016).

Importante mencionar que a evolução clínica de crianças nascidas com a CZS ainda está sob investigação, pois as crianças ainda estão se desenvolvendo, com cerca de 4-5 anos de idade. No Rio de Janeiro, 216 bebês infectados pelo ZIKV^{BR} e acompanhados desde a infecção materna revelaram neurodesenvolvimento abaixo da média e / ou avaliações oculares ou auditivas anormais em 31,5% das crianças entre 7 e 32 meses de idade (NIELSEN-SAINES et al., 2019). As crianças avaliadas pelo Bayley-III (Bayley Scales of Infant and Toddler Development, terceira edição, Bayley-III; domínios cognitivo, de linguagem e motor), 12% pontuaram abaixo de -2 dp. (pontuação <70; uma pontuação de 100 ± 2 s.d. é o intervalo) em pelo menos um domínio; e 28% pontuaram entre -1 e -2 s.d. em qualquer domínio (pontuações <85-70). A função da linguagem foi a mais afetada, com 35% de 146 crianças abaixo da média. Resultados de melhora no desenvolvimento neurológico foram observados em crianças do sexo feminino, bebês a termo, crianças com exames de vista normais e infecção materna mais tarde na gravidez ($P = 0,01$). Também foi observado resolução da microcefalia com neurodesenvolvimento normal em duas de oito crianças, desenvolvimento de microcefalia secundária em duas outras crianças e transtorno do espectro do autismo (TEA) em três crianças previamente saudáveis no segundo ano de vida (NIELSEN-SAINES et al., 2019). Além deste estudo, outros estudos também mostraram a possibilidade destas crianças portarem o TEA, além da CZS, ao compararem a neuropatogênese com pacientes controle.

Uma hipótese para essas alterações permanentes do neurodesenvolvimento poderia se basear na resposta produzida em defesa à infecção, que acabariam se tornando danosas ao longo do tempo. É bem conhecido que IL-6 é uma citocina chave envolvida no autismo (LI et al., 2009), mostrando que alterações na resposta imunológica durante a gestação podem influenciar no neurodesenvolvimento fetal. Hamel et al., (2015) identificaram o TLR3 como o receptor imunológico inicial envolvido na detecção da infecção pelo ZIKV em fibroblastos humanos levando a respostas de IFN tipo I e tipo II. Olganier et al., (2016) sugeriram que a infecção viral das células progenitoras neurais fetais poderiam ativar as respostas imunes TLR3,

levando a uma desregulação dos genes que controlam a apoptose, resultando em graves danos ao cérebro embrionário. Todas essas questões inflamatórias são relevantes quando se trata de uma infecção viral, uma vez que o sistema imunológico pode responder de forma diferente. Além disso, no caso do ZIKV, infecções anteriores por outros flavivírus, como o vírus da dengue e a febre amarela, podem desencadear uma resposta imunológica secundária de magnitude diferencial dada a grande semelhança molecular de alguns epítomos imunogênicos entre esses vírus correlacionados (VIANNA et al., 2018). Entretanto, é importante pontuar que cada indivíduo afetado poderá ter uma evolução clínica única, a depender de diversos fatores que podem passar pelo momento da infecção durante a gestação e, portanto, a relação causal do nível de acometimento até a genética individual, cujas características únicas podem influenciar diretamente no desfecho da síndrome.

Um estudo realizado in vitro com NPC de gêmeos dizigóticos e discordantes portadores da CZS revelaram que os gêmeos afetados apresentavam maior suscetibilidade ao ZIKV em comparação com as células dos não afetados (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018; AMARAL et al., 2020). Além disso, as NPC de bebês portadores da CZS mostravam uma assinatura de expressão gênica significativamente diferente dos reguladores das vias mTOR e Wnt, vias essenciais para o neurodesenvolvimento, e uma replicação de ZIKV significativamente maior e crescimento celular reduzido, o que demonstram claramente o papel da predisposição ou resistência genética ao ZIKV (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018), como já foi visto para outras infecções virais, como a Hepatite B (DANDRI, 2020), Hepatite C (PEREZ et al., 2019) e COVID-19 (CHLAMYDAS et al., 2021). Por fim, a análise por exoma em 18 bebês CZS afetados em comparação com 5 gêmeos não afetados e 609 controles excluiu um modelo monogênico para explicar a resistência ou maior suscetibilidade ao desenvolvimento de CZS (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018). O estudo ainda sugere que o CZS não é um evento estocástico e depende da suscetibilidade intrínseca da NPC, possivelmente relacionada a mecanismos epigenéticos (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018). O termo epigenética é usado para se referir as modificações da regulação genética ocasionadas por estímulos ambientais. Essas alterações podem persistir nas gerações seguintes de células, passando de célula mãe para filha durante a replicação, conhecido como regulação genética transgeracional (DEANS E MAGGERT, 2015). A patogenicidade e a gravidade das manifestações clínicas causadas por arbovírus provavelmente envolvem mecanismos de regulação

epigenética, presentes na interface hospedeiro-patógeno (BLAIR; OLSON, 2015). Um exemplo, o miR-3614-5p modificou a expressão de adenosina desaminase que atuam no RNA (ADAR1), uma enzima de edição de RNA que se esperava ter um papel antiviral, mas que, ao contrário, foi relatada como facilitadora da replicação viral do vírus da Dengue (DENV), desta forma, confirmando o papel do miR-3614 como regulador da infecção pelo DENV (DIOSA-TORO et al., 2017). Outro estudo mostrou que o cluster de miRNA do cromossomo 19 trofoblástico (C19MC) pode regular a suscetibilidade de células não trofoblásticas ao ZIKV (BAYER et al., 2018).

Outro estudo utilizando trofoblastos de gêmeos discordantes portadores da CZS mostrou que, após a exposição in vitro de ZIKV^{BR}, estas células foram significativamente mais suscetíveis à infecção por ZIKV^{BR} quando comparados com trofoblastos de não afetados (AMARAL et al., 2020). O perfil do transcriptoma não revelou diferenças nos níveis de expressão gênica dos fatores de adesão candidatos do ZIKV, receptores de IFN e IFN nos trofoblastos, antes ou depois da infecção por ZIKV^{BR} (AMARAL et al., 2020). A infecção por ZIKV^{BR} causou, apenas nos trofoblastos de gêmeos portadores da CZS, a regulação negativa de genes relacionados à organização da matriz extracelular e à ativação leucocitária, que são importantes para a adesão do trofoblasto e ativação da resposta imune. Além disso, apenas trofoblastos de gêmeos não afetados secretaram quantidades significativamente aumentadas de quimiocinas RANTES / CCL5 e IP10 após infecção com ZIKV^{BR} (AMARAL et al., 2020).

Em relação ao tratamento ou prevenção da infecção congênita, estudos avançaram recentemente, trazendo dados de que o sofosbuvir, um antiviral aprovado pelo FDA para o tratamento de Hepatite C, é eficiente. O sofosbuvir é uma droga que inibe a replicação do HCV durante a síntese de novos genomas virais (MURAKAMI et al., 2010; SOFIA et al., 2010), capaz de inibir a replicação do ZIKV in vitro e in vivo, além de ser considerado uma droga “protetora” em modelos in vivo (KRISTEN et al., 2017; MESCI et al., 2018). Outro estudo in vitro analisou o efeito da Hesperetina e Hesperidina como inibidores das proteases do Zika vírus e Chikungunya (EBERLE et al., 2021). A Hesperetina é um flavonoide encontrado em frutas cítricas, conhecido por seu poder antioxidante, anticarcinogênico, vasoprotetor e apresentar outras propriedades terapêuticas (LEWINSOHN et al., 1989). O estudo presumiu que a Hesperetina possui uma estrutura química que serve como uma molécula de ponto de partida para desenvolver um inibidor potente para combater as infecções por

Chikungunya e ZIKV por meio da inibição das proteases do vírus (EBERLE et al., 2021). Um estudo utilizando cloroquina, um medicamento usado no tratamento e profilaxia de malária em regiões onde a malária é susceptível ao seu efeito (MENGESHA et al., 1999), reduz o número de células infectadas pelo ZIKV in vitro e inibiu a produção de vírus e a morte celular promovida pela infecção pelo ZIKV sem efeitos citotóxicos (DELVECCHIO et al., 2016). O mesmo estudo também mostrou que o tratamento com cloroquina reverteu parcialmente as alterações morfológicas induzidas pela infecção por ZIKV em neuroesferas de camundongo (DELVECCHIO et al., 2016).

2.2 MODELAGEM DE DOENÇAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

A técnica de reprogramação celular permite gerar células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês *induced Pluripotent Stem Cell* - iPSC) a partir de células somáticas, trazendo um novo cenário para o meio científico permitindo gerar modelos celulares complexos para o estudo de doenças in vitro. Inicialmente, a técnica consiste na incorporação de uma combinação de 4 genes exógenos (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc), que induzem as células a expressarem genes endógenos presentes em células embrionárias (pluripotentes) (TAKAHASHI et al., 2007). Uma vez as células reprogramadas em iPSC, é possível induzir a diferenciação para o tipo celular de interesse usando fatores específicos e meios de cultura adequados.

Por conta da maior dificuldade de coleta de tecido cerebral vivo, o uso de iPSCs para modelagem de doenças que afetam o SNC tem se mostrado uma excelente ferramenta. Além disso, já que as células possuem o mesmo material genético das células somáticas originais, isso torna seu uso especialmente interessante para modelar doenças de genética complexa (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011). Ainda, a produção de iPSC e a geração de células-alvo das doenças permite a criação de uma plataforma onde é possível realizar testes com produtos fármaco-terapêuticos no tipo celular afetado pela doença. Por fim, por conservar o *background* genético do paciente, essa estratégia poderá ser aplicada na medicina personalizada.

As iPSC foram diferenciadas em neurônios pela primeira vez a partir de células de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença que apresenta degeneração dos neurônios motores (DIMOS et al.; 2008). Em 2009, células de

pacientes com atrofia muscular espinhal foram reprogramadas em neurônios motores, comprovando que células reprogramadas podem ser utilizadas para modelar doenças genéticas (EBERT et al., 2009). Desde então, muitos trabalhos têm usado a tecnologia de iPSC para estudar mecanismos e testar drogas que produzam uma melhora no fenótipo celular ou molecular de doenças que afetam o SNC (BRITO et al., 2018; BRAWNER et al., 2017; DE FILIPPIS et al., 2017; RUSSO et al., 2018; MARCHETTO et al., 2010).

Além da modelagem de doenças do neurodesenvolvimento e neurodegenerativas, diversos estudos têm utilizado a tecnologia de iPSC para modelar infecções virais no SNC. Em relação a microcefalia causada por ZIKV, o uso de iPSC permitiu comprovar a relação causal entre o vírus e a microcefalia. As iPSC foram diferenciadas em culturas 2D de células neuroprogenitoras, neurônios e células da glia, assim como também foram diferenciadas em modelos 3D, chamados de organoides cerebrais. O uso dessas células se mostrou extremamente útil para investigação e compreensão de como o ZIKV afeta o cérebro fetal (CUGOLA et al., 2016; TANG et al., 2016; ALVARADO et al., 2017; MESCI et al., 2017, MESCI et al., 2018).

A cepa Brasileira do ZIKV foi investigada pela primeira vez in vitro e in vivo por nosso grupo, revelando ser altamente neurotrópica e agressiva, causando morte celular por apoptose, especialmente em células progenitoras neurais (CUGOLA et al., 2016). Neste mesmo estudo, os organoides cerebrais humanos infectados com a cepa Brasileira apresentaram diminuição na camada cortical como consequência da morte de neurônios corticais imaturos (CUGOLA et al., 2016). Outro estudo, usando apenas a cepa do ZIKV Asiático, apresentou redução na camada neuronal em organoides cerebrais humanos (QIAN et al., 2016).

Além do tropismo do ZIKV, o tropismo e patogenicidade de DENV também foi modelado usando células derivadas de iPSC, com um foco particular em células semelhantes à micróglia. No caso do ZIKV, as células gliais infectadas propagaram o vírus e mantiveram a carga viral ao longo do tempo, levando à disseminação do vírus para as células suscetíveis. O DENV desencadeou respostas imunológicas mais fortes e foi eliminado pelas células neurais e gliais de forma mais eficiente (MUFFAT et al., 2018). Outro estudo modelou infecções por HSV-1 agudas e latentes em culturas de neurônios do SNC bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) derivados de iPSC (D'AIUTO et al., 2019). A infecção por HSV-1 dos organoides 3D foi capaz

de se espalhar da superfície externa do organoide e foi transportada para a lâmina interna, fornecendo um modelo para estudar o tráfego de HSV-1 através de estruturas de tecido neuronal complexas (D'AIUTO et al., 2019). Recentemente, o uso de iPSC também foi descrito para analisar os possíveis efeitos neurológicos causados pela infecção do SARS-CoV-2 (BULLEN et al., 2020). Partículas de vírus foram encontradas no corpo da célula neuronal estendendo-se em estruturas aparentes de neuritos. As medições de PCR corroboraram a replicação do vírus, sugerindo um aumento de pelo menos dez vezes nas cópias do vírus por RNA total (BULLEN et al., 2020).

Apesar do fenótipo causal da infecção pelo ZIKV no SNC ter sido elucidado, muitas questões em relação aos mecanismos de doença e as consequências da infecção congênita ainda permanecem em aberto. Nosso projeto se propõe a modelar o SNC de pacientes que nasceram com microcefalia por conta da infecção vertical por ZIKV, visando identificar fenótipos e vias que sofreram alterações permanentes pelo contato com o vírus durante a embriogênese, a fim de melhor compreender os mecanismos envolvidos na patogênese do ZIKV, inclusive a médio e longo prazo sem a presença do vírus.

3 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Esse trabalho teve como objetivo modelar o SNC de pacientes nascidos com SCZ, a fim de melhor compreender os mecanismos de patogênese do ZIKV no SNC durante a neurogênese e identificar fenótipos ocasionados pela infecção congênita nestes indivíduos.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar o fenótipo das células progenitoras neurais de pacientes nascidos com microcefalia causada pela infecção vertical pelo ZIKV;
- Investigar o fenótipo dos neurônios de pacientes nascidos com microcefalia causada pela infecção vertical pelo ZIKV; em termos de sinapses, funcionamento elétrico e conectividade;
- Investigar o fenótipo dos astrócitos de pacientes nascidos com microcefalia causada pela infecção vertical pelo ZIKV; em termos de produção e secreção de fatores que influenciam o funcionamento dos neurônios, incluindo citocinas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste projeto, foram seguidos os protocolos descritos a seguir.

4.1 COLETA E CULTIVO DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DE BIÓPSIA DA EPIDERME

Após aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisas em seres humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 1413), as amostras foram coletadas a partir de doadores voluntários após informe e consentimento do doador, mediante ciência e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

A coleta de fibroblastos foi feita através de biópsia da epiderme, em bebês submetidos a procedimentos cirúrgicos para colocação de derivação ventrículo-peritoneal para controle de hidrocefalia, do Instituto de Medicina Integral Fernando Figueira, em Recife. A biópsia de pele foi realizada com a remoção de aproximadamente 2 mm de tecido, e imediatamente o material foi colocado em tubo estéril contendo meio de transporte (DMEM-F12 e 5% de antibiótico, penicilina/estreptomicina). O material foi acondicionado a 4°C e em até 48h após a coleta foi transportado para o Laboratório de Modelagem de Doenças (LMD) do ICB em São Paulo, acondicionado à temperatura de 0° C.

No LMD, a amostra foi lavada 3 vezes em PBS com 5% de antibiótico, para evitar risco de contaminação da cultura. Após esse processo, o tecido foi picotado em pedaços menores. Os pedaços foram transferidos e distribuídos em uma placa de 6 poços, e com o auxílio de uma agulha, a amostra foi deslizada pelo poço, para auxiliar a aderência do tecido à placa. O tecido foi deixado em repouso até total aderência do mesmo à placa. Após isso, 2 mL de meio de cultura para fibroblasto foi adicionado à placa com extrema cautela para evitar que o tecido se solte. O meio de cultura utilizado é composto de DMEM-F12 (Life Technologies) contendo 15% de soro fetal bovino comum (SFB) (Life Technologies, CA, USA), 2% da solução de antibiótico-antifúngico (100U/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina e 0,5µg/mL anfotericina – Sigma, SL, USA Sigma-Aldrich), 1% de L-glutamina (Life Technologies). A cultura foi mantida a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade.

4.2 REPROGRAMAÇÃO CELULAR DE FIBROBLASTOS PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS A PARTIR DA TRANSFEÇÃO COM PLASMÍDEOS EPISSOMAIS

O protocolo para a produção das iPSC foi realizado a partir de transfecção de plasmídeos episomais por eletroporação com o auxílio de um eletroporador (Nucleofector™ – Lonza, USA) e do kit Epi5™ (Episomal iPSC Reprogramming Kit, Life Technologies, USA) contendo os fatores Oct3/4, Sox-2, Klf4 e L-Myc, além dos fatores Lin28, mp53DD e EBNA1.

Figura 3 – Esquema representativo do protocolo utilizado para a reprogramação de fibroblastos para iPSCs.

Fonte: (Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit, Life Technologies, USA, 2016)

Legenda: O protocolo para produção de iPSC através de transfecção de plasmídeos episomais se inicia no dia 0, onde após a eletroporação, as células são plaqueadas em placas previamente preparadas com Matrigel e mantidas em meio para fibroblastos por 24h. Após 24h, o meio é trocado para o meio N2 com B27 e bFGF e mantido nesta condição até o 15º dia após a reprogramação, com trocas de meio realizadas a cada 48h. Após o 15º dia, o meio é trocado por Essential 8, como sugerido pelo protocolo, ou por mTeSR, sendo este último trocado diariamente. As colônias de iPSC tendem a surgir em torno do 21º dia sendo, desta forma, coletadas e transferidas para placas preparadas com Matrigel e mantidas com mTeSR.

As células foram plaqueadas em uma placa de 100mm (Dias -4, -2) para alcançarem 90% de confluência no dia da infecção (Dia 0). O protocolo sugere a utilização de 1×10^5 células/mL, porém utilizamos 2×10^5 células/mL considerando o alto número de morte celular que ocorre por conta da eletroporação.

No dia 0, as células sofreram a eletroporação no equipamento (Quadro 1), o qual abre a membrana celular permitindo a entrada dos plasmídeos para o citoplasma celular. Após a eletroporação, as células foram plaqueadas em uma placa de 6 poços

previamente preparadas com Matrigel (BD Biosciences, NJ, USA) e foram mantidas por 24h em meio de fibroblastos.

Quadro 1 – Parâmetros utilizados na eletroporação de fibroblastos

Voltagem do pulso	Comprimento do pulso	Número de pulsos
1650 V	10 ms	3

Fonte: (Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit, Life Technologies, USA, 2016)

No dia 1, o meio foi trocado para o meio N2B27, composto por DMEM/F-12 com HEPES (Life Technologies, CA, USA), N-2 Supplement (100X) (Life Technologies, CA, USA), B-27™ Supplement (50X) (Life Technologies, CA, USA), MEM Aminoácidos não essenciais (10 mM) (Life Technologies, CA, USA), GlutaMAX™-I (100X) (Life Technologies, CA, USA), β -Mercaptoethanol (Life Technologies, CA, USA), suplementado com fator de crescimento de fibroblasto (bFGF - Life Technologies) (100 ng/mL). O meio foi trocado a cada 2 dias, até o 14º dia.

No dia 15, o meio foi ser trocado para um meio específico para iPSC. O protocolo sugere a utilização de Essential 8™ (Life Technologies, CA, USA), porém utilizamos mTeSR (Stem Cell Technologies), sendo esse último trocado diariamente.

As células foram mantidas nessa placa até o surgimento das primeiras colônias de iPSC, o que deve ocorrer em torno do 21º dia. As colônias foram transferidas para placas previamente preparadas com Matrigel (BD Biosciences, NJ, USA), condição considerada “livres de MEF” (do inglês *feeder free*) e mantidas em meio mTSeR, sendo esse último trocado diariamente.

4.2.1 Cultivo e expansão das células-tronco pluripotente induzidas (iPSC)

O cultivo das iPSC foi realizado diariamente com a troca do meio de cultura mTeSR (Stem Cell Technologies) e a expansão dessas células foi realizada mediante necessidade. As células foram mantidas em placas tratadas com Matrigel (BD Biosciences, NJ, USA) em condições *feeder free*.

4.3 PRODUÇÃO DE NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS DERIVADAS DE PACIENTES PORTADORES DA SINDROME CONGÊNITA DO ZIKA VIRUS E CONTROLES

4.3.1 Produção de corpos embrióides

As colônias de iPSC foram plaqueadas em matrigel (BD Biosciences, NJ, USA) e mantidas por cinco dias no meio mTSeR (Stem Cell Technologies, YVR, Canadá). No quinto dia, o meio foi substituído por meio N2 1x (DMEM/F12 suplementado com N2 1x- Life Technologies, CA, USA) e dois inibidores de SMAD, sendo 1 μ M de dorsomorfina (Tocris, MO, USA) e 10 μ M de SB431542 (Stemgent, MA, USA) por 48 horas. Após dois dias nessas condições, as colônias foram raspadas da placa e cultivadas em suspensão para formação de corpos embrióides (EB) por 1 semana em rotação de 90 rpm em meio N2 suplementado com dorsomorfina e SB431542.

4.3.2 Produção de rosetas e células progenitoras neurais (NPC)

Para obtenção das rosetas, os corpos embrióides foram coletados e transferidos para uma nova placa tratada com Matrigel para adesão e mantidas com meio NBF (DMEM/F12 (Life Technologies) suplementado com 0,5x N2 (Life Technologies), 0,5x B27 (Life Technologies), 20ng/mL de bFGF-2 (Life Technologies) e 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich)). Após a adesão dos EBs à matriz, as rosetas se formam em torno de aproximadamente 48 horas, sendo mantidas por até onze dias. As rosetas foram monitoradas diariamente para avaliar o momento adequado para a coleta das células progenitoras neurais (NPC), que crescem no seu interior. As NPC foram coletadas manualmente utilizando o microscópio EVOS (Life Technologies), dissociadas suavemente e plaqueadas em placas revestidas com 10 μ g/mL poliornitina (Sigma-Aldrich) em plástico e 1 μ g/mL em superfícies de vidro, e revestida com 2,5 μ g/mL de laminina (Life Technologies) em plástico e 5 μ g/mL para superfícies de vidro. A expansão das NPC foi realizada utilizando o meio de cultura NBF, como descrito acima.

4.3.3 Produção de neurônios a partir de iPSC de pacientes portadores da síndrome congênita do Zika vírus e controles

Para produção de neurônios, aproximadamente, um milhão de NPC foram plaqueadas em placas de 100mm previamente tratadas com poliornitina e laminina. No dia do plaqueamento, as células foram mantidas no meio de cultivo de NPC, ou seja, o NBF. Após 24 horas do plaqueamento, o meio NBF foi removido e substituído por NB contendo 10 μ M de inibidor da via de ROCK (Y-27632, Calbiochem, Milipore, DA, Germany). As células foram mantidas nesse meio por 48 horas e então, o meio foi novamente substituído por somente meio NB. O meio NB foi mantido por, no mínimo, 28 dias sendo trocado a cada 3-5 dias, período considerado suficiente para a diferenciação neuronal. As células foram monitoradas diariamente com o auxílio de um microscópio óptico para verificar a morfologia dos neurônios.

4.3.4 Produção de astrócitos a partir de iPSC de pacientes portadores da síndrome congênita do Zika vírus e controles

Para produção de astrócitos, NPC foram cultivadas em placas de 100mm de diâmetro. Ao atingirem 90% de confluência, as células foram incubadas com PBS à 37 °C durante 5 minutos, e em seguida, as células foram raspadas com o auxílio de um *cell scraper* e transferidas para placas de seis poços para formarem neuroesferas em meio NBF e agitação constante (90 RPM).

No dia seguinte, dia 2 do protocolo, o FGF foi removido e o inibidor da via de ROCK foi adicionado em uma concentração final de 5mM e mantido por 48h junto ao meio NB. Após esse período, o meio NB foi utilizado sem FGF durante uma semana. No 11º dia de protocolo, o meio de crescimento de astrócitos AGM (do inglês *Astrocyte Growth Medium* – Lonza, USA) foi adicionado no período de duas semanas. Durante esse período, as células permaneceram sob agitação constante de 90 RPM.

Após o período de três semanas de diferenciação em agitação, as neuroesferas foram plaqueadas em placas previamente tratadas com poliornitina e laminina. Quando as neuroesferas aderiram à placa, os astrócitos foram liberados e começaram a crescer por toda extensão da placa. Após a primeira passagem, as células que cercam as neuroesferas foram dissociadas enzimaticamente utilizando Accutase (Corning, Virginia, USA).

4.4 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS GERADAS

Após a produção e cultura das células geradas a partir de fibroblastos, a caracterização ocorrerá segundo os tópicos:

4.4.1 Análise Morfológica

As células foram submetidas a análise morfológica diária com o auxílio de microscopia óptica de luz e foram fotografadas semanalmente. As células foram analisadas e fotografadas pelo microscópio EVOS (Thermo Fisher Scientific).

4.4.2 Análise Fenotípica das Células (Imunofluorescência)

Para caracterização, as células foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínula de vidro até atingirem em torno de 80% de confluência. Em seguida, as células foram lavadas por 3 vezes com PBS e fixadas em 4% de paraformaldeído (USB Corporation) durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após fixação, as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com 0,1% de Triton (Promega, WI, USA) por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram submetidas ao bloqueio em PBS contendo 2% de Albumina Sérica Bovina (BSA) durante 4 horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas com anticorpos primários específicos descritos abaixo (Quadro 2) para completa caracterização das células geradas por 16 horas a 4°C. Passado o período de incubação dos anticorpos primários, as células foram lavadas por três vezes com PBS e submetidas a um novo bloqueio em PBS contendo 2% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, os anticorpos secundários Alexa Flour 488, Alexa Fluor 555 e Alexa Flour 647 (Life Technologies) foram adicionados de acordo com os primários e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. Por fim, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e DAPI (1µg/mL) foi adicionado por 5 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas utilizando ProLong Gold (Life Technologies). As iPSC, NPC e astrócitos tiveram sua imunorreatividade avaliada pelo microscópio de fluorescência EVOS (Thermo Fisher Scientific). As imagens dos neurônios foram capturadas como *z-stacks* em um microscópio DMI8

(Leica Microsystems) com os seguintes parâmetros: *magnification* em 40x (morfologia) e 63x (*puncta*), *number of stacks*: ~100. Além disso, as imagens foram submetidas a deconvolução nos seguintes parâmetros: *deconvolution = blind*, *number of iterations = 10*, *resize to 16-bit* = habilitado. Esses parâmetros foram atribuídos no software LAX-S (Leica Microsystems).

Quadro 2 – Anticorpos utilizados para caracterização celular

Anticorpos Primários	Fabricante	Diluição
anti-Vimentina	Cell Signaling	1:100
anti-Lin28	RD Systems	1:100
anti-SOX2	Cell Signaling	1:500
anti-Oct4	Abcam	1:100
anti-Nanog	ABR	1:100
anti-Nestina	Abcam	1:100
anti-Musashi1	Abcam	1:1000
anti-MAP2	Abcam	1:1000
anti-GFAP	Abcam	1:500
anti-S100B	Novus Bio	1:500

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

4.4.3 Extração de RNA e produção de cDNA

O RNA celular total foi extraído utilizando Trizol Reagente (Life Technologies). Todos os pellet de RNA foram ressuspensos em 30uL de água destilada livre de RNase e quantificados utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Nanodrop Technologies), sendo assim, estocados a -80°C. O cDNA foi sintetizado a partir de 1ug de RNA obtido usando o kit *SuperScript III Reverse Transcription* (Life Technologies). Ambos protocolos foram realizados de acordo com a descrição dos fabricantes.

4.4.4 Análise Molecular por PCR quantitativo (qPCR)

O cDNA obtido da extração de RNA foi submetido a PCR quantitativo (qPCR) utilizando SYBR green Supermix (Bio-Rad – CA, USA). Cada amostra foi testada em triplicata. Os oligonucleotídeos foram sintetizados para genes específicos usando as

sequências disponíveis no *Harvard Primer Bank online* (Quadro 3). As condições do ciclo de PCR foram as seguintes: ativação da polimerase e denaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Foi utilizado GAPDH como controle interno (*housekeeping gene*). Todas as análises foram feitas por quantificação absoluta. Em seguida, os dados foram comparados e analisados no GraphPad Prisma 8 (GraphPad, CA, USA), utilizando análise de variância (ANOVA).

Quadro 3 – Oligonucleotídeos utilizados para a caracterização celular por PCR em tempo real (qPCR)

Gene	Sense	Antisense
Vimentina	5'GGAAGCCGAAAACACCCTG3'	5'GAGACGCATTGTCAACATCCT3'
Nanog	5'TTTGTGGGCCTGAAGAAACT3'	5'AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG3'
Sox2	5'CTCGTGCAGTTCTACTCGTCG3'	5'AGCTCTCGGTGAGGTCCTTT3'
Nestina	5'CAACAGCGACGGAGGTCTC3'	5'GCCTCTACGCTCTCTTCTTTGA3'
Map2	5'CGAAGCGCCAATGGATTCC3'	5'TGAACTATCCTTGACAGACACCT3'
Sinapsina 1	5'AGTTCTTCGGAATGGGGTGAA3'	5'CAAAGTGGGTAGTCTCCGTT3'
PSD95	5'TCGGTGACGACCCATCCAT3'	5'GCACGTCCACTTCATTTACAAAC3'
GFAP	5'CTGCGGCTCGATCAACTCA3'	5'TCCAGCGACTCAATCTTCCTC3'

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

4.4.5 Análise de Glutamato

O sistema de transporte e captação do glutamato em neurônios foi analisado pela medida da eficiência na captação de glutamato presente no meio de cultura, por um ELISA utilizando o kit da Abnova, de acordo com as instruções do kit pelo fabricante (Abnova, Taipei City, Taiwan). Em seguida, os dados foram comparados e analisados no GraphPad Prisma 8 (GraphPad, CA, USA), utilizando análise de variância (ANOVA).

4.4.6 Quantificação de sinapses

Para quantificação de sinapses, um protocolo de imunofluorescência foi realizado nos neurônios usando os anticorpos anti-MAP2 para marcar os filamentos neuronais, anti-sinapsina 1 (proteína pré-sináptica) e anti-PSD95 (proteína pós-sináptica) (Quadro 4). A contagem da *puncta* foi realizada através da colocalização da

proteína pré-sináptica com a proteína pós-sináptica utilizando o software *ImageJ*. Os dados gerados foram comparados e analisados no GraphPad Prisma 8 (GraphPad), utilizando análise de variância (ANOVA).

Quadro 4 - Anticorpos utilizados para quantificação de sinapses dos neurônios gerados a partir das células tronco pluripotentes induzidas derivadas de fibroblastos de pacientes portadores da síndrome congênita do Zika vírus.

Anticorpos Primários	Fabricante	Diluição
anti-MAP2	Abcam	1:1000
anti-PSD95	Invitrogen	1:200
anti-Synapsina1	Milipore	1:500

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

4.4.7 Detecção e quantificação de citocinas em astrócitos e neurônios

Os neurônios e astrócitos e seus sobrenadantes foram coletados em triplicata após 1, 24, 48, 72 e 96 h, e analisados por técnica de Luminex xMAP magnética. Os níveis de citocinas foram normalizados pelo número de células e apresentados quanto a sua produção por unidade celular. Essa etapa foi realizada em colaboração com o Dr. Paulo Emílio Corrêa Leite, da Universidade Federal Fluminense (UFF).

Neste ensaio, as seguintes citocinas foram verificadas em sobrenadantes de neurônios e astrócitos: IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, eotaxina, bFGF, GCSF, GM-CSF, IFN- γ , CXCL10/IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, CCL5-RANTES, TNF- α e VEGF. O controle positivo utilizado foi TNF- α na concentração de 20ng/mL. O experimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

5 RESULTADOS

5.1 ANAMNESE DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS E CONTROLES

Desde o 1º semestre de 2017 até o presente, os pacientes deste projeto foram selecionados pelos médicos colaboradores, responsáveis por uma coorte de bebês nascidos com microcefalia, atendidos em Cabo do Santo Agostinho e no Hospital Infantil Maria Lucinda, ambos no Estado de Pernambuco. Um total de vinte e três pacientes foram selecionados de acordo com a anamnese e cujas características clínicas estão apresentadas nos quadros 3 e 4. De maneira geral, a condição para a inclusão no projeto era que o bebê tivesse nascido vivo com microcefalia causada pela infecção vertical com ZIKV na epidemia de 2015 no estado do Pernambuco, epicentro da epidemia. Evidentemente, todos os bebês que entraram no projeto, atualmente têm cerca de 5 anos de idade, porém a idade dos pacientes no momento da coleta das amostras clínicas eram entre 2 e 3 anos, sendo estas usadas neste projeto.

Ainda em relação as amostras clínicas, vinte amostras de pele foram coletadas, além de três amostras de soro sanguíneo e seis amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) para análises futuras no projeto. A cultura células de fibroblastos da pele foi obtida com sucesso para 11 pacientes. Para os outros pacientes, onde não houve sucesso no estabelecimento da cultura celular. O principal motivo para tanto foi a falta de aderência da amostra na placa, onde o pedaço de tecido é deixado livre de líquidos para “secar” e aderir na placa (apresentado no protocolo no item 4.1). Nas primeiras amostras, este tempo de aderência foi em torno de 5 a 10 minutos, o que percebemos posteriormente não ter sido eficiente para que os tecidos aderissem de forma a permitirem o espraio das células a partir do tecido de origem. Após estas experiências infrutíferas, o protocolo foi adaptado e as amostras passaram a ficar “secando” por mais tempo. A partir desta nova adaptação ao protocolo, a maior parte das amostras subsequentes aderiram a placa permitindo o espraio das células, permitindo o sucesso no cultivo celular.

Infelizmente, para algumas amostras não houve o estabelecimento da cultura celular mesmo após a adaptação do protocolo, sendo o principal motivo contaminação da cultura celular com bactérias, não sendo possível identificar se a contaminação

ocorreu durante o cultivo ou se a amostra já havia sido contaminada na origem da coleta.

Como pacientes controle desse estudo, utilizamos células pluripotentes induzidas derivadas de polpa dentária de pacientes neurotípicos estabelecidas no nosso laboratório (RUSSO et al., 2018). Apesar das células não serem fibroblastos como as células utilizadas para a reprogramação extraídas dos pacientes com CZS, os nossos controles têm sido acompanhados a cerca de 10 anos pelo nosso laboratório e tiveram um neurodesenvolvimento normal desde a coleta até o momento, sem nenhum fenótipo clínico. Além disso, ficamos temerosos de utilizar amostras de controles pareados na faixa etária dos pacientes com CZS por não podermos prever como seria o neurodesenvolvimento dos mesmos e caso viessem a desenvolver algum quadro do neurodesenvolvimento em um futuro próximo, isso inviabilizaria sua condição de “controle”.

Quadro 5 - Total de amostras recebidas para o estudo “Modelagem celular de bebês nascidos com microcefalia causada por infecção vertical por Zika vírus” de março de 2017 até abril de 2018 contendo informações gerais sobre os pacientes.

Código do paciente	Tipo de amostra coletada	Sexo	Data de nascimento	Estado	Teve contato com ZIKV	Diagnóstico da microcefalia	Sucesso no cultivo celular
PZ1	Pele	M	-	-	Sim	-	Não
PZ2	Soro	F	-	-	-	-	-
PZ3	LCR / Soro / Pele	M	13/12/2015	PE	Sim	Ao nascimento	Não
PZ4	LCR / Pele	M	-	-	Sim	-	Sim
PZ5	LCR / Soro / Pele	F	25/11/2015		Sim	30 semanas de gestação	Não
PZ6	LCR	F	07/10/2015	PE	-	9º mês de gestação	-
PZ7	LCR / Soro	F	12/11/2015	-	-	-	-
PZ8	LCR / Pele	F	26/10/2015	PE	Sim	-	Não
PZ9	Pele	M	-	-	Sim	-	Não
PZ10	Pele	M	-	-	Sim	-	Sim
PZ11	Pele	M	27/09/2015	PE	Sim	27 semanas de gestação	Sim
PZ12	Pele	F	-	-	Sim	Ao nascimento	Sim
PZ13	Pele	M	09/11/2015	PE	Sim	Ao nascimento	Sim
PZ14	Pele	M	23/10/2015	PE	Sim	-	Sim
PZ15	Pele	M	-	-	Sim	-	Sim
PZ16	Pele	F	25/11/2015	PE	Sim	6º mês de gestação	Não
PZ17	Pele	F	21/11/2015	PE	Sim	27 semanas de gestação	Não
PZ18	Pele	F	-	-	Sim		Sim
PZ19	Pele	M	-	-	Sim	Ao nascimento	Não
PZ20	Pele	M	22/11/2015	PE	Sim	8º mês de gestação	Sim
PZ21	Pele	M	12/05/2015	PE	Sim	-	Sim
PZ22	Pele	M	-	-	Sim	-	Sim
PZ23	Pele	M	30/12/2015	PE	Sim	7º mês de gestação	Não

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: M – Masculino, F – Feminino, PE – Pernambuco, “-” – Ausência de informações do paciente

Quadro 6 – Anamnese dos pacientes que enviaram amostras para o estudo “Modelagem celular de bebês nascidos com microcefalia causada por infecção vertical por Zika vírus” de março de 2017 até abril de 2018 com dados clínicos.

Código do paciente	Dados clínicos						
	Apresenta microcefalia?	Irritabilidade	Hiperexcitabilidade	Disfagia	Interação social	Crise convulsiva	Hidrocefalia
PZ1	-	-	-	-	-	-	-
PZ2	-	-	-	-	-	-	-
PZ3	Sim	Sim	Sim	Sim	Sem contato visual	Sim	Sim
PZ4	Sim	-	-	-	-	-	-
PZ5	Sim	Não	Sim	Sim	Fixa e acompanha com interação pobre	Sim	Sim
PZ6	-	-	-	-	-	-	-
PZ7	-	-	-	-	-	-	-
PZ8	Sim	Sim	Não	Sim	Sem contato visual	A família negou qualquer episódio	Não
PZ9	Sim	-	-	-	-	-	-
PZ10	Sim	-	-	-	-	-	-
PZ11	Sim	Sim	Sim	Sim	Fixa o olhar, mas não acompanha	Sim	Não
PZ12	Sim	-	-	-	-	-	-
PZ13	Sim	Sim	Não	Sim	Sem contato visual	Não	Não
PZ14	Sim	Sim	Sim	Sim	Sem contato visual	Sim	Sim
PZ15	Sim	-	-	-	-	-	-
PZ16	Sim	Não	Não	Sim	Sem contato visual	Sim	Sim
PZ17	Sim + Calcificações	Não	Não	Sim	Sem contato visual	Sim	Não
PZ18	Sim	-	-	-	-	-	-
PZ19	Sim	-	-	-	-	-	-
PZ20	Sim	Sim	Sim	Sim	Boa interação, tem sorriso social	Sim	Não
PZ21	Sim	Não		Sim	Bom contato, sorriso social	A família negou qualquer episódio	Não
PZ22	Sim	-	-	-	-	-	-
PZ23	Sim	-	Sim	Sim	Sem contato visual	Sim	Não

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: “-” – Ausência de informações do paciente

5.2 CULTIVO CELULAR DOS FIBROBLASTOS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS

As amostras foram processadas de acordo com sua data de chegada ao laboratório e, por isto, foram processadas em dias diferentes. Todos os materiais seguiram o mesmo protocolo de digestão e redução do tamanho original (técnica de explante), a fim de facilitar a aderência do tecido e das células na placa (FERNANDES et al., 2016).

As culturas passaram em torno de um mês na incubadora, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ e foram analisadas a cada três dias em microscopia de luz. O meio de cultura foi trocado a cada 5 dias, com todo o cuidado para evitar soltar os tecidos aderidos à placa.

Seguindo o protocolo já estabelecido na literatura, em média, as amostras aderiram e apresentaram crescimento celular com morfologia fusiforme na superfície da placa em torno de duas a três semanas. A cultura permaneceu por mais 20 dias na incubadora e foi amplificada durante esse período. O processo das amostras até seu congelamento levou em torno de três meses, em média, podendo haver um maior tempo de cultivo entre uma amostra em outra (Figura 4).

Os cultivos celulares que foram estabelecidos foram estocados em nitrogênio líquido (-196°C). A partir do momento que obtivemos o número esperado de pacientes para iniciar a reprogramação, utilizamos o protocolo do kit “Epi5” (Invitrogen, EUA) contendo os 4 fatores de Yamanaka (TAKAHASHI et al., 2007) em forma de plasmídeos episomais.

Figura 4 – Foto representativa de microscopia de luz de fibroblastos de pele de pacientes com CZS.

A

B

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: A) Tecido aderido soltando células. B) Células em primeira passagem.
Magnificação: 4x. Barras de aumento de 200µm.

5.3 TRANSFEÇÃO DOS FIBROBLASTOS E GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS DE PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS

Foram realizadas seis tentativas de reprogramação utilizando transfecção por eletroporação. Ao todo, 7 pacientes portadores de CZS foram reprogramados, porém, para a modelagem e produção de células do SNC, selecionamos 4 pacientes. Todas as células utilizadas para as reprogramações foram submetidas a PCR para verificar a existência de micoplasma (Figura 5).

Para a transfecção com plasmídeos de reprogramação celular foi realizada a eletroporação com um choque de intensidade para células mesenquimais dos pacientes PZ11, PZ13, PZ14, PZ15, PZ20, PZ21 e PZ22. Infelizmente, não é possível indicar qual era a intensidade do choque aplicada nas células por ser um programa do aparelho que não revela essa intensidade. A decisão de usar uma intensidade do choque diferente da indicada pela programação do eletroporador, ou seja, usamos o programa para células mesenquimais ao invés de para fibroblastos, se deu após observarmos um aumento significativo de morte das células após o choque, o que não ocorreu com a mesma frequência quando usamos o programa para células mesenquimais.

A transfecção foi realizada quando as placas estavam com os fibroblastos com 80% de confluência. No primeiro dia após a eletroporação foi possível observar algumas células em formato piramidal que anteriormente apresentavam uma morfologia fusiforme, indicando um possível sofrimento celular por conta do procedimento. A partir do 15º dia era possível observar conglomerados celulares em morfologia esferóide, indicando provável sucesso na reprogramação celular. Aproximadamente a partir do 20º dia após a eletroporação foi possível observar a formação de algumas pequenas colônias, variando de um paciente para o outro. No 25º dia, colônias arredondadas bem formadas e com borda bem delimitada eram o indicativo do sucesso da reprogramação celular. Portanto, podemos dizer que as células estavam completamente reprogramadas em iPSC após 30 dias da transfecção e estavam prontas para serem coletadas. As células reprogramadas foram cultivadas em condição *feeder free*, ou seja: livre da camada de sustentação de fibroblastos murinos, em placas previamente preparadas com Matrigel (Figura 6). Após a formação das colônias neste primeiro mês de reprogramação células, pelo menos 2 clones

foram coletados de cada um dos pacientes. Além dos clones, as colônias que não foram coletadas e isoladas foram denominadas como “pool” e estocadas em nitrogênio líquido (-196°C).

Em relação a morfologia das células reprogramadas, é facilmente observada a aparência de células pluripotentes quando as iPSC são plaqueadas em condições *feeder-free*, em Matrigel, ou seja, células arredondadas, com núcleo grande e citoplasma escasso. As colônias são planas e com borda bem delimitada e definida (Figura 7). Todas as características acima citadas foram observadas em todos os pacientes e controles.

Figura 5 – PCR para identificação de micoplasma

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: A primeira coluna contém o padrão de peso molecular. As colunas 2 a 8, respectivamente, contém amostras do sobrenadante do cultivo celular dos pacientes PZ11 (coluna 2), PZ13 (coluna 3), PZ14 (coluna 4), PZ15 (coluna 5), PZ20 (coluna 6), PZ21 (coluna 7) e PZ22 (coluna 8), a coluna 9 apresenta à amplificação de um fragmento de DNA, a qual representa o controle positivo da reação, a coluna 10 contém uma amostra de água utilizada na extração do RNA e a coluna 11 apresenta o controle negativo.

Figura 6 – Fotomicrografia em luz branca representativa das fases de reprogramação celular de fibroblastos em iPSC.

Fonte: (BENAZZATO, 2021).

Legenda: As fotos foram adicionadas ao projeto de acordo com as mudanças significativas do protocolo. No 1º dia, o meio de cultura é alterado para um meio específico do kit contendo fatores de crescimento para manter a célula. No 15º dia, as células passam a receber o meio mTeRS (Stem Cell Technologies, YVR, CA), meio específico para células-tronco. A partir do 25º dia, as colônias de iPSCs podem ser observadas e coletadas para cultivo específico. Magnificação: 4x. Barras de aumento de 200µm.

Figura 7 – Fotomicrografia em luz branca representativa da morfologia das colônias de iPSC.

Fonte: (BENAZZATO, 2021).

Legenda: As colônias são planas e com bordas bem delimitadas, com células de núcleo grande e citoplasma escasso. Magnificação: 4x. Barras de aumento de 200 μ m.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC) DERIVADAS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS

A caracterização das iPSC geradas a partir de fibroblastos dos pacientes com a CZS e dos controles foi realizada através dos ensaios de PCR quantitativo e imunofluorescência para analisar a presença de marcadores específicos de pluripotência. Os resultados obtidos foram semelhantes em ambos os grupos.

A expressão gênica verificada através de um ensaio de qPCR evidenciou que as iPSC expressavam marcadores de pluripotência como Nanog e SOX2 (Figura 8A).

As colônias de iPSC analisadas via ensaio de imunofluorescência mostraram a expressão significativa dos marcadores de pluripotência Lin28, Sox2, Oct3/4 e Nanog (TAKAHASHI et al., 2007) nas iPSC controle e CZS (Figuras 8B-C).

Estes resultados em conjunto comprovam que houve a reprogramação dos fibroblastos para iPSC.

Figura 8 – Caracterização das iPSC obtidas a partir de fibroblastos reprogramados de pacientes que nasceram com a síndrome congênita do Zika vírus.

A

B

C

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: A) Análise da expressão gênica dos marcadores de pluripotência Nanog e SOX2 por qPCR, mostrando que as iPSC apresentaram alta expressão dos genes de pluripotência. B-C) Fotomicrografia em ensaio de imunofluorescência confirmando a presença de marcadores de pluripotência Lin28, Nanog, Oct3/4 e SOX2 nas iPSC de pacientes com a CZS e controles. B-C) Magnificação: 4x. Barras de aumento de 200µm.

5.5 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS DERIVADAS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS

Para a produção das células progenitoras neurais (NPC) foi realizado o protocolo conforme descrito no item 4.3.2. A partir das iPSC, foram produzidos os corpos embrióides (EB), que geraram as rosetas neurais. As NPC se encontram dentro das rosetas e foram coletadas após um período de 5 a 11 dias para observar a maturação e momento ideal para a coleta. As NPC foram mantidas em placas previamente preparadas com poliornitina e laminina até atingirem 90% de confluência da placa (Figura 9).

A expressão de genes característicos de NPC foram verificadas através da técnica de qPCR, sendo observada a expressão dos genes Nestina, marcador específico para proteína de filamento intermediário expresso em NPC (CHANDRASEKARAN et al., 2017), e SOX2 em ambos os grupos de pacientes (Figura 10A).

Por ensaios de imunofluorescência foi possível observar a presença de marcadores para NPC como SOX2, Musashi1 (marcador específico de NPC) (D'AIUTO et al., 2014) e Nestina. Por outro lado, estas células foram negativas para MAP2, sendo este um marcador específico para proteína associada a microtúbulos, sendo parte do citoesqueleto e utilizado para marcação positiva em neurônios (LOGAN et al., 2019) (Figura 10B-C).

Estes resultados em conjunto comprovam que as células obtidas através da diferenciação celular são, de fato, células progenitoras neurais.

Figura 9 – Fotomicrografias de microscopia de luz representativas das células de pacientes que nasceram com a CZS, e controles, utilizadas neste trabalho, mostrando as etapas desde os fibroblastos até as NPC.

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: Imagens das células e das etapas do protocolo para produção de células progenitoras neurais. A partir dos fibroblastos, foram obtidas as iPSC, corpos embrióides, rosetas neurais e NPC. Magnificação: 20x. Barras de aumento de 50µm.

Figura 10 – Caracterização de células progenitoras neurais obtidas a partir de fibroblastos reprogramados de pacientes que nasceram com a síndrome congênita do Zika vírus.

A

B

C

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: A) Análise de expressão gênica das NPC por qPCR para os marcadores de células progenitoras neurais (Nestina e SOX2). B-C) Fotomicrografias feitas após ensaio de imunofluorescência mostrando a expressão positiva de marcadores de NPC como SOX2, Nestina, Musashi 1 e negativa para MAP2. B-C) Magnificação: 20x. Barras de aumento de 50µm.

5.6 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NEURÔNIOS DERIVADOS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS E CONTROLES

A partir do protocolo descrito no item 4.3.3, células progenitoras neurais (NPC) foram induzidas à diferenciação neuronal, cujo resultado é uma cultura mista contendo cerca de 80% de neurônios e 20% de astrócitos. O primeiro passo para a diferenciação neuronal inicia-se a partir da cultura de NPC com aproximadamente 80% de confluência da placa. Nas primeiras 48 horas do início do protocolo, com a presença de inibidor da ROCK (Ri) e ausência de fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), não foi possível notar qualquer alteração morfológica nas células. Conforme as semanas foram passando, foi possível observar alterações significativas na morfologia até chegar na quarta semana de diferenciação, onde obtemos o aspecto morfológico de neurônios, com células apresentando pequenos corpos celulares com muitas projeções e ramificações, em sua grande parte, bem alongadas (Figura 11A).

Após quatro semanas de diferenciação, o aspecto da morfologia dos neurônios gerados a partir dos fibroblastos e dos controles foram similares a descrição feita anteriormente (Figura 11B).

Para caracterização molecular, a expressão de marcadores neuronais foi avaliada por qPCR. A expressão dos neurônios obtidos para MAP2 foi semelhante comparada entre os grupos, e a expressão de Musashi 1 foi drasticamente reduzida em comparação às NPC, comprovando a diferenciação neuronal (Figura 12A).

A expressão de marcadores característicos para neurônios foi verificada por imunofluorescência nas células submetidas a diferenciação neuronal. A expressão de MAP2, foi observada em todos os pacientes e controles. Um fato observado neste ensaio foi a falta da marcação de GFAP em 2 dos 4 pacientes portadores da CZS selecionados do estudo. Por este motivo, dividimos os grupos de pacientes em 2 grupos: o grupo com marcação para GFAP positivo (CZS/A) e o grupo sem marcação de GFAP (CZS/B) para dar seguimento às análises (Figura 12B-C-D).

Como mencionado, a diferenciação neuronal gera uma cultura mista com neurônios e astrócitos. A proporção de cerca 4 neurônios para 1 astrócito é importante para garantir o funcionamento dos neurônios. É possível notarmos uma redução significativa da presença de astrócito nas culturas mistas ao compararmos o grupo

CZS/B com o grupo controle. Em contrapartida, o grupo CZS/A apresentou proporções semelhantes ao grupo controle (Figura 12E).

Com base nesses resultados, é possível considerar que o protocolo de diferenciação produziu neurônios com morfologia e marcadores neuronais, porém com alterações na proporção entre neurônios e astrócitos entre os pacientes em comparação com o grupo controle.

Figura 11 – Fotomicrografias de microscopia de luz representativas das células de pacientes que nasceram com a CZS, e controles, utilizadas neste trabalho, mostrando as etapas desde as NPC até diferenciação neuronal.

A

B

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: A) Fotomicrografia de campo claro representativa das alterações morfológicas ocorridas durante o processo de diferenciação neuronal. Magnificação: 10x. Barras de aumento de 100µm. B) Imagens representativas dos neurônios de

pacientes controle e CZS após 4 semanas de diferenciação neuronal.
Magnificação: 20x. Barras de aumento de 50 μ m.

Figura 12 – Caracterização de neurônios obtidos a partir de fibroblastos reprogramados de pacientes CZS e controles.

A

B

C

D

E

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: A) Análise de expressão gênica após a diferenciação neuronal. Neurônios obtidos apresentaram expressão de MAP2, ao contrário das NPC que apresentam uma baixa expressão destes marcadores. Por outro lado, é possível observar uma menor expressão de Musashi 1, marcador de NPC. B-C) Fotomicrografias feitas após ensaio de imunofluorescência. As culturas celulares revelam células expressando MAP2 e pouca marcação para GFAP. Não houve marcação de Musashi 1. D) Fotomicrografias feitas após ensaio de imunofluorescência. As culturas celulares revelam células expressando MAP2 e não houve marcação para GFAP e Musashi 1. E) Quantificação da porcentagem de células existentes na cultura mista de neurônios. É possível observarmos que o grupo CZS/A tem proporções semelhantes ao grupo controle, enquanto o grupo CZS/B apresentou uma redução significativa em comparação ao controle. B) Magnificação: 40x. Barras de aumento de 20µm. C-D) Magnificação: 20x. Barras de aumento de 50µm.

5.6 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ASTRÓCITOS DERIVADOS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS E CONTROLES

A cultura de astrócitos foi produzida utilizando o protocolo descrito no item 4.3.4. Este protocolo é realizado para podermos caracterizar os astrócitos e sua verificar sua funcionalidade, uma vez que astrócitos são essenciais à sobrevivência e manutenção dos neurônios e que na cultura mista sua porcentagem é baixa em relação aos neurônios, mascarando seu funcionamento (Figura 13).

Para a caracterização da expressão gênica dos astrócitos foram realizados ensaios de qPCR visando comparar a expressão de marcadores específicos após a diferenciação astrocitária. Os resultados mostraram que os astrócitos expressavam marcador específico, como o GFAP (LOGAN et al., 2019), e menor expressão para Nestina (Figura 14A).

A caracterização dos astrócitos foi feito através de ensaio de imunofluorescência para observar sua morfologia, onde é possível ver células estreladas e grandes. É possível observar a marcação de GFAP, porém não houve marcação para Vimentina, marcador específico do filamento intermediário do citoesqueleto, expresso pelos astrócito (LOGAN et al., 2019) (Figura 14 B-C).

Figura 13 – Fotomicrografias de microscopia de luz representativas das células de pacientes que nasceram com a CZS, e controles, utilizadas neste trabalho, mostrando as etapas desde as NPC até diferenciação para astrócitos.

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda:

A) Fotomicrografias representativas das alterações morfológicas ocorridas durante o processo de diferenciação para astrócitos. Magnificação: 10x. B) Imagens representativas dos astrócitos de pacientes controles e CZS após 7 semanas de diferenciação para astrócitos. Magnificação: 20x. Barras de aumento de 50µm.

Figura 14 – Caracterização de astrócitos obtidos a partir de fibroblastos reprogramados de pacientes que nasceram com CZS e controles.

A

B

C

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: A) Análise da expressão gênica após a diferenciação para astrócitos. Os astrócitos obtidos expressaram GFAP e apresentaram baixa expressão de Nestina, marcador específico de progenitoras neurais. B-C) Fotomicrografias feitas após ensaio de imunofluorescência. As culturas celulares revelam expressão de GFAP nos astrócitos controle e dos pacientes CZS. Não houve marcação para Nestina. Magnificação: 40x. Barras de aumento de 20µm.

5.8 QUANTIFICAÇÃO DE SINAPSES EM NEURÔNIOS DERIVADOS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS E CONTROLES

Com base nos resultados obtidos no item 5.6, é possível considerar que o protocolo de diferenciação neuronal produziu neurônios, com morfologia e marcação característicos destas células. O ensaio de quantificação de sinapses foi realizado para inferir a funcionalidade neuronal nos pacientes considerando os dois grupos CZS/A e CZS/B em comparação com os controles, já que o grupo CZS/B apresentou uma proporção reduzida de astrócitos em relação ao grupo CZS/A e controle e isto poderia influenciar na sinaptogênese neuronal.

A análise foi realizada de acordo com o item 4.8.6, utilizando os marcadores específicos para as proteínas pré- (Sinapsina 1, em verde) e pós-sináptica (PSD95, em vermelho) (LOGAN et al., 2019) (Figura 15B). Os filamentos neuronais foram marcados com MAP2 (em branco) para mapear os prolongamentos neuronais para auxiliar na contagem da *puncta* sináptica, que é a colocalização entre os marcadores pré- e pós-sinápticos. A análise e contagem dos pontos foi realizada através do software *ImageJ*.

Nesse ensaio foi observado que as proteínas sinápticas dos neurônios dos pacientes que nasceram com a CZS reduziram de forma significativa a proteína pré-sináptica Sinapsina 1 em ambos os grupos CZS/A e CSZ/B quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$). No caso da proteína pós-sináptica PSD95, também houve uma redução significativa em ambos os grupos CZS/A e CZS/B em comparação ao controle ($p = 0,0003$), com notadamente uma menor expressão para o grupo CZS/B em relação ao CZS/A. Ao analisar a colocalização dos marcadores, esta diminuição foi ainda mais acentuada entre os pacientes CZS e o grupo controle ($p < 0,0001$). Todas as análises deste experimento foram realizadas via software GraphPad Prism 8, com análise estatística por análise de variância (ANOVA) (Figura 15C).

Considerando os dados apresentados, é possível afirmar que os neurônios de pacientes que nasceram com a síndrome congênita do Zika vírus apresentam redução no número de sinapses em relação aos neurônios do grupo controle.

Figura 15 – Quantificação das sinapses dos neurônios obtidos a partir de fibroblastos reprogramados de pacientes que nasceram com CZS e controles.

A

B

C

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: A) Análise da expressão gênica dos genes Sinapsina 1 (pré-sináptico) e PSD-95 (pós-sináptico) em neurônios com 4 semanas de diferenciação por qPCR. Houve uma redução significativa nos níveis de expressão dessas proteínas nos neurônios de pacientes com

CZS quando comparados ao controle ($p < 0,0001$). B) Fotomicrografia após ensaio de imunofluorescência para a expressão dos marcadores pré e pós sinápticos nos neurônios de pacientes CZS/A, CZS/B e controles. É possível observar marcação para Sinapsina 1 (verde), PSD-95 (vermelho) e MAP2 (branco). Os círculos mostram a colocalização das proteínas pré- e pós-sinápticas, sendo esta considerada a *puncta*. Magnificação: 63x. Barras de aumento de 10 μ m. C) Análise da contagem das *punctas* sinápticas para os marcadores pré- ($p < 0,0001$) e pós-sinápticos ($p = 0,0003$), assim como sua colocalização. Observamos uma redução significativa no número de eventos sinápticos nos neurônios de pacientes com CZS em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$).

5.9 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GLUTAMATO EXTRACELULAR EM CULTURA DE ASTRÓCITOS E DE NEURÔNIOS DERIVADOS DE PACIENTES PORTADORES DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS E CONTROLES

Os níveis de glutamato no sobrenadante foram analisados nos seguintes tempos: 1h após a troca do meio, 24h, 48h, 72h e 96h, a fim de analisar a curva de captação do ciclo glutamato-glutamina. O ciclo de glutamato/GABA-glutamina é uma via metabólica em que consiste na liberação de glutamato a partir de neurônios (Figura 16).

Figura 16 – Esquema representativo do ciclo Glutamato - Glutamina

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: O glutamato (GLU) dos neurônios pré-sinápticos estimula os neurônios pós-sinápticos, e o sinal é encerrado pela captação de GLU da fenda sináptica para os astrócitos. O GLU é transportado principalmente para os astrócitos através de transportadores de aminoácidos excitatórios dependentes de Na^+ , EAATs. Isso interrompe o gradiente de Na^+ do astrócito e a energia é consumida pela Na^+/K^+ -ATPase para restaurar as concentrações iônicas. GLU é convertido em: (a) glutamina (GTN) via glutamina sintase (GS) ou (b) alfa-cetoglutarato (αKG) por glutamato desidrogenase (GDH) ou aspartato aminotransferase (AAT) para subsequente metabolismo oxidativo no ciclo de Krebs. GTN é transportado para os neurônios para a produção de glutamato pela glutaminase ativada por fosfato (PAG) e o GLU resultante é recaptado em vesículas para posterior liberação sináptica.

Em contrapartida, os astrócitos captam o glutamato e liberam a glutamina, que é absorvida pelos neurônios para utilização como precursor da síntese de glutamato. Em todos os pontos experimentais dos pacientes portadores da CZS, foi possível observar menores concentrações de glutamato no sobrenadante de astrócitos e neurônios em comparação ao grupo controle (Figura 17A).

O ensaio também foi realizado em culturas de neurônios de pacientes portadores da CZS e dividido em dois grupos, assim como feito anteriormente. O grupo CZS/A e CZS/B produziram menor quantidade de glutamato em comparação com o grupo controle. O grupo CZS/B produziu quantidade ainda menor de glutamato em relação ao grupo CZS/A, mas a redução não se mostrou significativa entre os dois grupos CZS. O grupo com menos astrócitos (CZS/B) produziu menos glutamato do que o grupo com mais astrócitos presentes na cultura mista de neurônios (Figura 17B).

Em ambos os gráficos é possível notar o padrão do aumento de glutamato presente no sobrenadante das células ao longo do tempo. No caso dos astrócitos, como a cultura é de apenas astrócitos, a curva revela a capacidade de captação de astrócitos, já que o meio de cultura já conta com essa substância na sua composição, mas também se observa um aumento da quantidade de glutamato, revelando que sob condições específicas e controladas, essas células são capazes de produzir esse neurotransmissor se estimuladas para tanto. Observa-se uma redução significativa ($P < 0,0371$) nos níveis glutamato em astrócitos e uma redução não significativa nos níveis de neurônios em comparação com os respectivos controles.

Figura 17 – Análise de glutamato do sobrenadante de astrócitos e neurônios obtidos a partir de fibroblastos reprogramados de pacientes que nasceram com a síndrome congênita do Zika vírus.

A

B

Fonte: (BENAZZATO, 2021)

Legenda: A) Análise de captação de glutamato em sobrenadante de culturas de astrócito. Em relação com o controle, existe uma redução nos níveis de glutamato em todos os tempos medidos, porém a curva segue o mesmo padrão ao comparar os dois grupos. B) Análise de produção de glutamato em sobrenadante de culturas de neurônio. O gráfico foi dividido em dois grupos para melhor análise. Existe uma redução na produção de glutamato em comparação com o grupo controle. Os níveis de glutamato foram normalizados pela quantidade total de células.

5.10 ANÁLISE DE CITOCINAS DE ASTRÓCITOS E NEURÔNIOS DERIVADOS DE PACIENTES COM MICROCEFALIA PELA INFECÇÃO DO ZIKV

Amostras de sobrenadante de neurônios e astrócitos de pacientes com CZS e controle foram coletadas após 48h, para analisar os analitos produzidos por estas células utilizando a técnica de Luminex xMAP magnética. Este experimento tem como intenção quantificar: IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, eotaxina, bFGF, GCSF, GM-CSF, IFN- γ , CXCL10/IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, CCL5-RANTES, TNF- α e VEGF.

O ensaio foi realizado em colaboração com o Dr. Paulo Emílio Corrêa Leite, da Universidade Federal Fluminense (UFF). As amostras foram condicionadas a -80°C e transportadas em gelo seco.

Em decorrência a falha no transporte, as amostras chegaram após o horário ideal para a pausa do experimento, desta forma, reduzindo a sensibilidade do teste. Outras amostras não relacionadas a este projeto apresentaram a mesma dificuldade de obtenção de dados e, por este motivo, foi descartada a hipótese de problemas com as amostras. Por conta deste fato, não foi possível obter informações sobre essas amostras.

6 DISCUSSÃO

O ZIKV, por muito tempo, esteve associado apenas a manifestações brandas em humanos, causando febre baixa, *rash* cutâneo, artralgia e conjuntivite (LANCIOTTI et al., 2008). Porém, em 2015, casos de microcefalia passaram a ser descritos na região Nordeste do Brasil e associados a uma síndrome congênita causada pela infecção vertical do ZIKV (FRANÇA et al. 2016, OLIVEIRA et al, 2016; VAN DER LINDEN et al, 2016).

A modelagem neuronal a partir de células de crianças que nasceram com a microcefalia causada pela síndrome congênita do Zika vírus e a produção de neurônios e astrócitos nunca havia sido realizada até o presente momento. Estudos *in vitro* utilizando células posteriormente infectadas com ZIKV foram realizados para estudar o SNC e apresentaram susceptibilidade viral em NPC, além de morte celular causada pela ação do vírus, provando seu neurotropismo e que os astrócitos são reservatórios para o ZIKV no cérebro fetal e a apoptose moderada combinada com a resposta antiviral ineficiente dessas células pode contribuir para o estabelecimento de infecção cerebral crônica associada às anormalidades do neurodesenvolvimento do ZIKV (CUGOLA et al., 2016; QIAN et al., 2017; CAIRES-JÚNIOR et al., 2018; LIMONTA et al., 2018).

Neste projeto, buscamos modelar, *in vitro*, as células do SNC de pacientes que nasceram com microcefalia consequente da CZS, visando uma maior compreensão dos efeitos da infecção do ZIKV durante o neurodesenvolvimento, mas ainda preservando o background genético dos pacientes afetados, uma vez que isso pode ser um dos fatores a influenciar no perfil de doença de cada indivíduo, como já foi verificado para o próprio ZIKV e para outras infecções virais (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018; D'AIUTO et al., 2019; AMARAL et al., 2020). A modelagem consistiu na reprogramação de células obtidas por biópsia de pele dos pacientes e a produção de iPSC a partir dos fibroblastos. Os fibroblastos foram obtidos através da colaboração com profissionais do Hospital de Cabo do Santo Agostinho e no Hospital Infantil Maria Lucinda, ambos no Estado de Pernambuco. As amostras foram coletadas de crianças que passaram por procedimento cirúrgicos, em sua grande maioria, por problemas decorrentes da CZS e enviadas para São Paulo para fazerem parte desse projeto. As células alvo da reprogramação, os fibroblastos de pele, foram escolhidos devido a

facilidade de obtenção desse material e principalmente manutenção da viabilidade para o transporte. Importante salientar que nosso grupo já apresentou que células de polpa dentária humana estão entre as melhores opções para reprogramação e posterior modelagem de transtornos neurológicos, uma vez que são células com a mesma origem embrionária (ambas derivadas da crista neural) (Beltrão-Braga et al, 2011). Entretanto, neste trabalho foi preciso coletar amostras biológicas de crianças com menos de 3 anos de idade, o que nos impediu de termos acesso a primeira dentição e impeliu a procurar outra fonte de células que seriam viáveis para a reprogramação celular. No início, consideramos a utilização de células mononucleares de sangue periférico, as PBMCs, porém a ideia foi logo descartada por conta da necessidade de grande volume de sangue (no mínimo de 6 mL por amostra), se tornando um risco para a saúde dos bebês (HUBEI et al., 2019; MEITAL et al., 2019). Por fim, como os pacientes selecionados para o nosso estudo precisaram passar por procedimentos cirúrgicos, em sua grande maioria por problemas relacionados a CZS, oferecendo a possibilidade de coleta de uma pequena biópsia de pele, vantajoso em relação ao sangue inclusive considerando a viabilidade celular possibilitando o envio do material de Recife para ser processado em São Paulo. A partir da obtenção e estabilização do cultivo desses fibroblastos, o próximo passo foi a reprogramação celular.

Para a reprogramação celular dos fibroblastos e obtenção das iPSC, escolhemos o método de transfecção utilizando plasmídeos episomais, que carregam os 4 fatores de Yamanaka (Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4). A técnica de transfecção foi escolhida por ser uma técnica não integrativa, impedindo o potencial de modificações no genoma celular (YU et al, 2009). A reprogramação celular dos fibroblastos foi bem sucedida em 7 pacientes das 19 amostras enviadas (dados não apresentados). Para a modelagem do SNC deste trabalho, apenas 4 pacientes foram utilizados para a análise fenotípica com a produção de neurônios e astrócitos, opção feita, principalmente, em função do tempo que pode ser disponibilizado para a produção deste trabalho em função da pandemia de Coronavírus que assolou o mundo desde 2020. A seleção desses pacientes foi de acordo com sua anamnese, apresentada no item 5.1 deste projeto. Os 3 controles deste projeto foram selecionados de pacientes reprogramados já disponíveis no laboratório. A razão desta escolha, além da dificuldade de obtenção de biópsia de pele de pacientes controles na mesma idade que os pacientes do grupo CZS, foi em razão de termos realizado o

acompanhamento dos pacientes controle desde a coleta dos dentes de leite até a idade adulta, acompanhando todo o desenvolvimento infantil e garantindo que esses pacientes não apresentaram qualquer transtorno relacionado ao neurodesenvolvimento ao longo do tempo. O tempo de reprogramação levou em torno de 1 ano até o estabelecimento completo do protocolo. Durante o processo de reprogramação, algumas dificuldades foram encontradas. Entre elas, a alta taxa de morte celular após o processo de eletroporação da célula. Ao detectarmos que essa poderia ser uma das causas, alteramos a programação previamente selecionada para fibroblastos para outro programa relacionado a células mensequimais. Após essa alteração, ainda notamos que as culturas apresentavam dificuldade para manter o cultivo por todo o período estimado do protocolo, especialmente após adicionarmos o meio N2 com B27 e bFGF. Decidimos aumentar a concentração de bFGF disponível no meio, uma vez que o bFGF é um fator de crescimento celular (COLEMAN et al., 2014), e assim obtivemos maior taxa de sucesso no cultivo dessas células. Outra dificuldade encontrada foi o alto número de contaminações que as culturas de células apresentavam em torno do 15º dia de cultivo após a reprogramação. Após perdermos algumas placas, passamos a adicionar antibiótico (penicilina / estreptomicina) no cultivo e obtivemos sucesso na obtenção das iPSC. Para todos os ensaios, foram utilizados 2 clones de cada paciente e 1 clone de cada controle, totalizando 11 clones neste estudo.

As iPSC geradas nesse projeto se comportaram sem diferença significativa entre os pacientes com CZS e controle, tanto a nível morfológico, quanto a nível molecular. Os níveis de expressão gênica de Nanog e Sox2 não apresentaram qualquer diminuição ou aumento significativo quando comparada ao grupo controle. No âmbito morfológico, as iPSC geradas apresentaram-se similares a células-tronco embrionárias. Por ensaio de imunofluorescência, pudemos observar que todos os marcadores relacionados a iPSC foram marcados em ambos os grupos. Esse cenário já foi descrito para a caracterização e marcação das iPSC, comprovando o sucesso na reprogramação dos fibroblastos dos pacientes portadores da CZS (TAKAHASHI et al., 2007).

Como o objetivo deste estudo foi estudar os fenótipos celulares e moleculares envolvidos na CZS, após estabelecer a reprogramação dos fibroblastos e obter as iPSC, os protocolos de diferenciação neuronal e de astrócitos foram iniciados. Devido

à estudos anteriores em nosso laboratório, obtivemos com sucesso as células previstas.

Para a produção de neurônio, seguimos o protocolo descrito por Marchetto et al., (2010), onde a partir das iPSC são produzidos os corpos embrióides (EB), que são plaqueados para a obtenção de rosetas neurais. As NPC se originam dentro dessas rosetas neurais e são isoladas e coletadas após sua maturação.

As NPC geradas neste projeto se comportaram sem diferenças significativas entre os pacientes com CZS e controle. Em nível molecular houve uma redução não significativa na expressão dos marcadores Nestina e Sox2 do grupo com CZS em comparação com o grupo controle. No ensaio de imunofluorescência das progenitoras neurais, foi possível observar a marcação de todos as proteínas relacionadas as NPC e a marcação negativa para MAP2, marcador para neurônios, sendo este um resultado semelhante encontrado em outro trabalho que utilizou NPC derivada de iPSC de pacientes portadores da CZS (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018).

Uma vez que obtivemos as NPC e as caracterizamos, iniciamos o protocolo de diferenciação neuronal, que leva em torno de 4 a 5 semanas para a obtenção de neurônios. Todos os clones estudados nesse trabalho foram diferenciados com sucesso e, após 10 dias do início da diferenciação, já era possível observarmos alterações morfológicas indicando o processo de diferenciação. Após 30 dias, os neurônios produzidos mostraram expressão para o marcador específico de neurônio MAP2 e uma drástica redução, em relação as NPC apresentadas na Figura 9, no marcador específico de NPC Musashi 1, comprovando que as NPC foram diferenciadas e se tornaram neurônios. Isso foi visto no ensaio de imunofluorescência, onde o marcador MAP2 foi positivo e o Musashi1 teve marcação negativa. O marcador específico de astrócito, o GFAP, foi encontrado nas culturas dos pacientes controles e no grupo de pacientes CZS/A, porém não houve marcação na cultura dos pacientes CZS/B. É comum haver astrócitos na cultura de neurônios, uma vez que eles são responsáveis pelo suporte ao neurônio (RUSSO et al., 2018). A ausência ou redução na quantidade dessas células pode influenciar no funcionamento dos neurônios. No nosso estudo, observamos uma redução na produção de astrócitos na cultura mista de neurônios derivados do grupo CZS/B. Não é possível inferir se esta é uma característica desses pacientes, com uma maior tendência à produção de neurônios em detrimento da produção de astrócitos, durante a neurogênese, ou se este foi um artefato da cultura celular. Este achado carece de mais observação e replicatas

experimentais para verificação. Como é um achado interessante, não quisermos descartá-lo de apresentação, e iremos continuar essa investigação futuramente.

Uma vez que obtivemos os neurônios, houve a necessidade de analisar se os neurônios produziam sinapses químicas. A sinaptogênese é o processo de formação de sinapses entre os neurônios do sistema nervoso central (SÜDHOF, 2018). Para analisar o funcionamento dessas células, realizamos os ensaios de qPCR e imunofluorescência para analisar a expressão dos genes pré e pós-sinápticos (Sinapsina 1 e PSD95). Nos resultados de qPCR, houve uma drástica diminuição significativa na expressão desses genes, indicando que pacientes com CZS podem produzir menos sinapses do que os pacientes do grupo controle. Esse cenário também é visto no fluído cefalorraquidiano de pacientes com Doença de Alzheimer, doença neurodegenerativa, apresentando diminuição na expressão dos genes pré e pós-sinápticos (CAMPORESI et al., 2020), visto também in vitro em neurônios e astrócitos de pacientes com TEA (MARCHETTO et al., 2017; RUSSO et al., 2018) e em paciente com síndrome de Rett (MARCHETTO et al., 2010). Através do ensaio de imunofluorescência, pudemos realizar a contagem de *puncta* sináptica. A *puncta* nos permite quantificar os eventos sinápticos nos neurônios de todos os pacientes usados nesse trabalho. Para esse ensaio, o número de proteínas pré e pós-sinápticas, além de sua colocalização, foram contabilizadas manualmente a partir do software *ImageJ*. Os resultados obtidos apresentaram uma diminuição significativa nos números de pontos pré-sinápticos, pós-sinápticos e na colocalização entre elas em todos os pacientes com CZS em relação ao grupo controle. Além disso, ao separarmos o grupo CZS, é possível notar que o grupo CZS/A (que apresentou um número semelhante de astrócitos em sua cultura em comparação com o controle) apresentou mais ponto de colocalização e de proteínas pós-sináptica do que o grupo CZS/B (que apresentou uma redução significativa da presença de astrócitos na cultura celular em relação ao controle). O fato do grupo CZS/A apresentar a mesma proporção de neurônios e astrócitos que o grupo controle nos traz confiança de que de fato existe uma redução no número de sinapses químicas nestes pacientes. Este resultado também corrobora com estudos realizados em camundongos infectados com ZIKV e apresentaram redução nas sinapses (FIGUEIREDO et al., 2019). Estes resultados poderiam auxiliar na explicação de fenótipos clínicos desses pacientes com CZS, como déficits cognitivos por exemplo, por defeitos na comunicação das redes neuronais. Um estudo realizado com neurônios derivados de iPSC de pacientes com TEA apresentaram

neurogênese anormal e sinaptogênese reduzida levando a defeitos funcionais nas redes neuronais (MARCHETTO et al., 2016).

A análise de glutamato nos neurônios dos pacientes portadores da CZS nos mostrou um padrão na produção do glutamato, porém com significativa redução nos níveis de glutamato ao compararmos com o grupo controle. Assim como nos experimentos anteriores, decidimos analisar se a menor presença de astrócito na cultura mista de neurônios poderia alterar os níveis de glutamato presentes no sobrenadante e, de acordo com os nossos achados, houve uma redução não significativa nestes níveis ao comparar os grupos CZS/B com o grupo CZS/A. Esse cenário já foi visto em outros estudos *in vivo* (POTIER et al., 2010) e *in vitro* (TALANTOVA et al., 2013) em que a redução de sinapses foi influenciada pela redução dos níveis de glutamato. Sendo o glutamato um importante neurotransmissor, esse fato contribuiria para o mal funcionamento neuronal.

Além dos neurônios, decidimos estudar e entender o funcionamento dos astrócitos derivados dos pacientes com CZS. Os astrócitos são células da neuroglia, abundantes no sistema nervoso central e que providenciam suporte ao neurônio, inclusive na sinaptogênese (PHATNANI et al., 2015). Existem diversos estudos sobre o papel do astrócito em transtornos neurodegenerativos, como o Alzheimer (SIMPSON et al., 2010), e relacionados ao desenvolvimento neurológico, como o autismo (RUSSO et al., 2018).

Os astrócitos produzidos apresentaram fenótipos específicos deste tipo celular, como a expressão de GFAP e baixa expressão de Nestina, marcador de NPC, comprovando sucesso na diferenciação para astrócitos. O mesmo foi visto nos ensaios de imunofluorescência em astrócitos do grupo CZS e controle.

Além da análise do fenótipo celular e molecular dos astrócitos, decidimos analisar a via de glutamato-glutamina através do sobrenadante de astrócitos, uma vez que a captação do glutamato no meio extracelular é um processo importante exercido por essas células para evitar a neurotoxicidade e que pode apresentar alterações mediante infecções virais (VERKHRATSKY et al., 2018). De fato, na análise da concentração de glutamato extracelular de 5 pontos (1h após a troca do meio, 24h, 48h, 72h, 96h) vimos alterações significativas em que há relevante diminuição na concentração de glutamato em todos os pontos ao compararmos o grupo CZS com o grupo controle. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos na contagem de *puncta*, uma vez que o glutamato é age como um neurotransmissor excitatório,

atuando no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica, além de possuir um papel fundamental no mecanismo de algumas doenças neurodegenerativas. Existem estudos que levantam a hipótese sobre a forma de liberação de glutamato de astrócitos ser dependente de Ca^{2+} e se a presença de Ca^{2+} no meio pode interferir na liberação do glutamato (PARPURA et al., 1994; TALANTOVA et al., 2013). Talantova et al. (2013) mostrou que quando a presença de Ca^{2+} é omitida do meio de cultura, alguns peptídeos falham em induzir a liberação de glutamato. Ao adicionar Ca^{2+} novamente ao meio de cultura, essa função foi restaurada imediatamente (TALANTOVA et al., 2013).

O ensaio de citocinas para a análise do sobrenadante de neurônios e astrócitos dos pacientes portadores da CZS e controle foi planejado para quantificarmos 27 analitos utilizando a tecnologia de Luminex xMAP magnética. As amostras seriam levadas até Niterói, Rio de Janeiro, por transporte aéreo, porém houve impedimento do embarque das amostras. Por conta disso, as amostras foram acondicionadas em gelo seco e transportadas via transporte terrestre, chegando com 7 horas de atraso até o destino final. O ensaio foi iniciado no dia seguinte a chegada das amostras e as *beads* permaneceram incubadas por menos tempo do que o protocolo descrevia. Por esta razão, a sensibilidade do ensaio foi afetada, gerando erro em grande parte das amostras. Essa análise será refeita posteriormente para a quantificação das citocinas citadas acima.

Com esse trabalho e os resultados obtidos, podemos dizer que é possível modelar a CZS in vitro focando nos fenótipos celulares e moleculares. Ainda podemos inferir que há prejuízo no funcionamento de neurônios e astrócitos desses pacientes, que possivelmente pode ser correlacionado com características fenotípicas clínicas. Entretanto, mais estudos serão necessários para afirmar se as características são permanentes ou se haverá melhora no fenótipo dessas crianças à medida que avançam em idade. Em tempo, é importante ressaltar que apesar de termos caracterizado a infecção por ZIKV durante a gestação, não podemos descartar características genéticas de cada indivíduo estudado. Análises genéticas das crianças estudadas não foram realizadas neste trabalho, o que pode oferecer algum viés na análise dos resultados, uma vez que alguns tipos de mutações poderiam refletir em alterações do neurodesenvolvimento independente da infecção pelo ZIKV. Informações sobre o histórico familiar, bem como o acompanhamento desses pacientes desde seu nascimento podem auxiliar para a maior interpretação dos

resultados obtidos. Em tempo, infelizmente não foi possível realizar a análise do perfil de citocinas de astrócitos, nem os ensaios de eletrofisiologia dos neurônios, os quais serão realizados a posteriori, e certamente poderão auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade do ZIKV nos nascidos com CZS.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

- ❖ Os fibroblastos se apresentaram como uma boa opção para reprogramação celular e obtenção de iPSC para estudos de modelagem de doenças;
- ❖ Não foram observadas alterações morfológicas ou de genes específicos para os tipos celulares iPSC, NPC e astrócitos, em pacientes CZS e controles, utilizando a metodologia proposta neste trabalho.
- ❖ Os neurônios derivados de iPSC de pacientes portadores de CZS não apresentaram alteração em sua morfologia, expressão de genes específicos quando comparados com o grupo controle. Porém, a diferenciação neuronal gerou cultura mista para o grupo CZS/A e não para o grupo CZS/B, pois não houve marcação de GFAP apresentando uma redução significativa de astrócitos na cultura mista de neurônios;
- ❖ Os neurônios derivados de iPSC de pacientes portadores de CZS apresentaram menor expressão nas proteínas pré e pós-sinápticas quando comparados com o grupo controle;
- ❖ Os neurônios de pacientes portadores de CZS apresentaram menos eventos sinápticos do que os neurônios do grupo controle;
- ❖ Os astrócitos derivados de iPSC de pacientes portadores de CZS apresentaram o mesmo padrão na recaptação/produção do glutamato em relação ao controle, com uma redução significativa do glutamato.

REFERÊNCIAS

- ABBINK, P.; LAROCCA, R. A.; BARRERA, RAFAEL A.; BRICAULT, C. A.; MOSELEY, E. T.; BOYD, M.; KIRILOVA, M.; LI, Z.; NG'ANG'A, D.; NANAYAKKARA, O.; NITYANANDAM, R.; MERCADO, N. B.; BORDUCCHI, E. N.; AGARWAL, A.; BRINKMAN, A. L.; CABRAL, C.; CHANDRASHEKAR, A.; GIGLIO, P. B.; JETTON, D.; JIMENEZ, J.; LEE, BENJAMIN, C.; MOJTA, S.; MOLLOY, K.; SHETTY, M.; NEUBAUER, G. H.; STEPHENSON, K. E.; PERON, J. P. S.; ZANOTTO, P. M. A.; MISAMORE, J.; FINNEYFROCK, B.; LEWIS, M. G.; ALTER, G.; MODJARRAD, K.; JARMAN, R. G.; ECKELS, K. H.; MICHAEL, N. L.; THOMAS, S. J.; BAROUCH, D. H. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. **Science**, Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/early/2016/08/03/science.aah6157.full>>.
- ALVARADO, M.G.; SCHWARTZ, D.A. Zika virus infection in pregnancy, microcephaly, and maternal and fetal health: what we think, what we know, and what we think we know. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.141(1), p.26-32, 2017.
- AMARAL, M. S.; GOULART, E.; CAIRES-JUNIOR, L.C.; MORALES-VICENTE, D.A.; SOARES-SCHANOSKI, A; GOMES, R.P.; OLBERG, G.G.O.; ASTRAY, R.M.; KALIL, J.E.; ZATZ, M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Differential gene expression elicited by ZIKV infection in trophoblasts from congenital Zika syndrome discordant twins. *PLoS Negl Trop Dis* 14(8): e0008424, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008424>>.
- AMARAL, P.; RESENDE DE CARVALHO, L.; HERNANDES ROCHA, T. A.; DA SILVA, N. C.; VISSOCI, J. Geospatial modeling of microcephaly and zika virus spread patterns in Brazil. *PloS one*, 14(9), e0222668, 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222668>>.
- ARAGAO, M. F. V.; LINDEN, V. V. D.; BRAINER-LIMA, A. M.; COELI, R. R.; ROCHA, M. A.; SILVA, P. S.; CARVALHO, M. D. C. G.; LINDEN, A. V. D.; HOLANDA, A. C.; VALENCA, M. M. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **BMJ**, v.353, i1901, 2016.
- ARAUJO, L.M.; FERREIRA, M.L.; NASCIMENTO, O.J. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**. v.74, p.253-5, 2016.
- ARAUJO, T.V.B.; RODRIGUES, L.C.; XIMENES, R.A.A.; MIRANDA-FILHO, A.B.; MONTARROYOS, U.R.; MELO, A.P.L.; VALONGUEIRO, S.; ALBUQUERQUE,

M.F.P.M.; SOUZA, W.V.; BRAGA, C.; BRANDÃO FILHO, S.P.; CORDEIRO, M.T.; VAZQUEZ, E.; CRUZ, D.C.S.; HENRIQUES, C.M.P.; BEZERRA, L.C.A.; CASTANHA, P.M.S.; DHALIA, R.; MARQUES-JÚNIOR, E.T.A.; MARTELLI, C.M.T. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **Lancet Infect Dis.** 16: 1356–63, 2016.

BAUD, D.; GUBLER, D.J.; SCHAUB, B.; LANTERI, M.C.; MUSSO, D. An Update on Zika Virus Infection. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099–2109, 2017.

BARROWS, N. J.; CAMPOS, R. K.; POWELL, S. T.; PRASANTH, K. R.; SCHOTTLER, G.; SOTO-ACOSTA, R.; GALARZA-MUNÓZ, G.; MCGRATH, E. L.; URRABAZ-GARZA, R.; GAO, J.; WU, P.; RAMKUMAR, M.; SAADE, G.; FERNANDEZ-SALAS, I.; ROSSI, S. L.; VASILAKIS, N.; ROUTH, A.; BRADRICK, S. S.; GARCIA-BLANCO, M. A. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 20, n. 2, p.259-270, 2016.

BASU, R.; TUMBAN, E. Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. **Viol. J.** 13 (1), 165. 2016. Disponível em < <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0623-2>>.

BAYER, A.; LENNEMANN, N. J.; OUYANG, Y.; SADOVSKY, E.; SHERIDAN, M. A.; ROBERTS, R. M.; COYNE, C. B.; SADOVSKY, Y. Chromosome 19 microRNAs exert antiviral activity independent from type III interferon signaling. *Placenta*, 61, 33–38, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.11.004>

BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; PIGNATARI, G. C.; RUSSO, F. B.; FERNANDES, I. R.; MUOTRI, A. R. Disease in a dish: induced pluripotent stem cells as a novel model for developmental disorders. **Cytometry Part A**, v.83, n.1, p.11-17, 2013.

BELTRÃO BRAGA, P. C.; PIGNATARI, G. C.; MAIORKA, P.C.; OLIVEIRA, N. A.; LIZIER, N. F.; WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MUOTRI, A. R.; KERKIS, I. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from human immature dental pulp stem cells. **Cell transplantation**, v.20, n.11-12, p.1707-19, 2011.

BELL, T.M.; FIELD, E.J.; NARANG, H.K. Zika Virus Infection of the Central Nervous System of Mice by Intracerebral Inoculation of Newborn and 5-week-old Mice with Zika Virus. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, v.35, p.183-193, 1971.

BLAIR, C. D.; OLSON, K. E. The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. **Viruses**, 7(2), 820–843, 2015. <https://doi.org/10.3390/v7020820>

BLÁZQUEZ, A. B.; ESCRIBANO-ROMERO, E.; MERINO-RAMOS, T.; SAIZ, J. C.; MARTÍN-ACEBES, M. A. Stress responses in flavivirus-infected cells: Activation of unfolded protein response and autophagy. **Frontiers in Microbiology**, v.5, p.1-7, 2014.

BRAWNER, A.T.; XU, R.; LIU, D.; JIANG, P. Generating CNS organoids from human induced pluripotent stem cells for modeling neurological disorders. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**. v. 9, p. 101-111, 2017.

BRITO, A.; RUSSO, F.B.; MUOTRI, A.R.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B. Autism spectrum disorders and disease modeling using stem cells. **Cell Tissue Res**. v. 371, p. 153-160, 2018.

BULLEN, C. K.; HOGBERG, H. T.; BAHADIRLI-TALBOTT, A.; BISHAI, W. R.; HARTUNG, T.; KEUTHAN, C.; LOONEY, M. M.; PEKOSZ, A.; ROMERO, J. C.; SILLÉ, F.; UM, P.; SMIRNOVA, L. Infectability of human BrainSphere neurons suggests neurotropism of SARS-CoV-2. **ALTEx**, 37(4), 665–671, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.14573/altex.2006111>>.

CAIRES-JÚNIOR, L.C.; GOULART, E.; MELO, U.S.; ARAUJO, B.H.S.; ALVIZI, L.; SOARES-SCHANOSKI, A.; OLIVEIRA, D.F.; KOBAYASHI, G.S.; GRIESI-OLIVEIRA, K.; MUSSO, C.M.; AMARAL, M.S.; DASILVA, L.F.; ASTRAY, R.M.; SUÁREZ-PATIÑO, S.F.; VENTINI, D.C.; SILVA, S.G.; YAMAMOTO, G.L.; EZQUINA, S.; NASLAVSKY, M.S.; TELLES-SILVA, K.A.; WEINMANN, K.; VAN DER LINDEN, V.; VAN DER LINDEN, H.; OLIVEIRA, J.R.M.; ARRAIS, N.M.R.; MELO, A.; FIGUEIREDO, T.; SANTOS, S.; MEIRA, J.G.C.; PASSOS, S.D.; ALMEIDA, R.P.; BISPO, A.J.B.; CAVALHEIRO, E.A.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E.; NAKAYA, H. ANDREATA-SANTOS, R.; FERREIRA, L.C.S.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEE HO, P.; PASSOS-BUENO, M.R.; ZATZ, M. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nat Commun** 9, 475, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02790-9>>

CAMPORESI, E.; NILSSON, J.; BRINKMALM, A.; BECKER, B.; ASHTON, N. J.; BLENNOW, K.; ZETTERBERG, H. Fluid Biomarkers for Synaptic Dysfunction and Loss. **Biomarker insights**, 15, 1177271920950319, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1177271920950319>>.

CAO-LORMEAU, V.M.; BLAKE, A.; MONS, S.; LASTERE, S.; ROCHE, C.; VANHOMWEGEN, J.; DUB, T.; BAUDOUIN, L.; TEISSIER, A.; LARRE, P.; VIAL, A.L.; DECAM, C.; CHOUMET, V.; HALSTEAD, S.K.; WILLISON, H.J.; MUSSET, L.; MANUGUERRA, J.C.; DESPRES, P.; FOURNIER, E.; MALLET, H.P.; MUSSO, D.; FONTANET, A.; NEIL, J.; GHAWCHÉ, F. Guillain-Barré Syndrome outbreak

associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**. v. 387, p. 1531-1539, 2016.

CAO-LORMEAU, V.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; ROBIN, E.; BERRY, A.; MALLET, H.; SALL, A. A.; MUSSO, D. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v.20, p.1085-1086, 2013.

CAUCHEMEZ, S.; BESNARD, M.; BOMPARD, P.; DUB, T.; GUILLEMETTE-ARTUR, P.; EYROLLE-GUIGNOT, D.; SALJE, H.; KERKHOVE, M.D.V; ABADIE, V.; GAREL, C.; FONTANET, A.; MALLET, H.P. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. **Lancet**. 387: 2125–32, 2016.

CHANDRASEKARAN, A.; AVCI, H. X.; OCHALEK, A.; RÖSINGH, L. N.; MOLNÁR, K.; LÁSZLÓ, L.; BELLÁK, T.; TÉGLÁSI, A.; PESTI, K.; MIKE, A.; PHANTHONG, P.; BÍRÓ, O.; HALL, V.; KITTYANANT, N.; KRAUSE, K. H.; KOBOLÁK, J.; DINNYÉS, A. Comparison of 2D and 3D neural induction methods for the generation of neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem cell research*, 25, 139–151, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.10.010>

CHANG, C.; ORTIZ, K.; ANSARI, A.; GERSHWIN, M.E. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, v. 68, p. 1-13, 2016.

CHLAMYDAS, S.; PAPAVALASSILIOU, A. G.; PIPERI, C. Epigenetic mechanisms regulating COVID-19 infection. **Epigenetics**, 16(3), 263–270, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1796896>>.

COLEMAN, S.J.; BRUCE, C.; CHIONI, A.M.; KOCHER, H.M.; GROSE, R.P. The ins and outs of fibroblast growth factor receptor signalling. **Clinical Science**. 127 (4): 217–31, 2014. doi:10.1042/CS20140100. PMID 24780002.

CUGOLA, F. R.; FERNANDES, I. R.; RUSSO, F. B.; FREITAS, B. C.; DIAS, J. L.M.; GUIMARÃES, K. P.; BENAZZATO, C.; ALMEIDA, N.; PIGNATARI, G. C.; ROMERO, S.; POLONIO, C. M.; CUNHA, I.; FREITAS, C. L.; BRANDÃO, W. N.; ROSSATO, C.; ANDRADE, D. G.; FARIA, D. P.; GARCEZ, A. T.; BUCHPIGEL, C. A.; BRACONI, C. T.; MENDES, E.; SALL, A. A.; ZANOTTO, P. M. A.; PERON, J. P. S.; MUOTRI, A. R.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v.534, p.267-271, 2016.

D'AIUTO, L.; ZHI, Y.; KUMAR DAS, D.; WILCOX, M. R.; JOHNSON, J. W.; MCCLAIN, L.; MACDONALD, M. L.; DI MAIO, R.; SCHURDAK, M. E.; PIAZZA, P.; VIGGIANO, L.; SWEET, R.; KINCHINGTON, P. R.; BHATTACHARJEE, A. G.; YOLKEN, R.; NIMGAONKAR, V. L. Large-scale generation of human iPSC-derived

neural stem cells/early neural progenitor cells and their neuronal differentiation.

Organogenesis, 10(4), 365–377, 2014. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1080/15476278.2015.1011921>>.

D'AIUTO, L.; BLOOM, D. C.; NACIRI, J. N.; SMITH, A.; EDWARDS, T. G.; MCCLAIN, L.; CALLIO, J. A.; JESSUP, M.; WOOD, J.; CHOWDARI, K.; DEMERS, M.; ABRAHAMSON, E. E.; IKONOMOVIC, M. D.; VIGGIANO, L.; DE ZIO, R.; WATKINS, S.; KINCHINGTON, P. R.; NIMGAONKAR, V. L. Modeling Herpes Simplex Virus 1 Infections in Human Central Nervous System Neuronal Cells Using Two- and Three-Dimensional Cultures Derived from Induced Pluripotent Stem Cells.

Journal of virology, 93(9), e00111-19, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1128/JVI.00111-19>>.

DANDRI M. Epigenetic modulation in chronic hepatitis B virus infection. **Seminars in immunopathology**, 42(2), 173–185, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00780-6>

DE FILIPPIS, L.; ZALFA, C.; FERRARI, D. Neural Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells to Model Rare CNS Diseases. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. v. 16, p. 915-926, 2017.

DEANS, C.; MAGGERT, K. A. What do you mean, "epigenetic"? **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 887-96, Apr 2015. ISSN 0016-6731.

DELVECCHIO, R.; HIGA, L. M.; PEZZUTO, P.; VALADÃO, A. L.; GARCEZ, P. P.; MONTEIRO, F. L.; LOIOLA, E. C.; DIAS, A. A.; SILVA, F. J.; ALIOTA, M. T.; CAINE, E. A.; OSORIO, J. E.; BELLIO, M.; O'CONNOR, D. H.; REHEN, S.; DE AGUIAR, R. S.; SAVARINO, A.; CAMPANATI, L.; TANURI, A. Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models. **Viruses**, 8(12), 322, 2016. <https://doi.org/10.3390/v8120322>

DIALLO, D.; SALL, A. A.; DIAGNE, C. T.; FAYE, O.; BA, Y.; HANLEY, K. A.; BUENEMANN, M.; WEAVER, S. C.; DIALLO, M. Zika virus emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. **PLoS One**, v.9, p.4-11, 2014.

DICK, G. W.; 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, p.509–520, 1952.

DIMOS, J. T.; RODOLFA, K. T.; NIAKAN, K. K.; WEISENTHAL, L. M.; MITUSMOTO, H.; CHUNG, W.; CROFT, G. F.; SAPHIER, G.; LEIBEL, R.; GOLAND, R.; WICHTERLE, H.; HENDERSON, C. E.; EGGAN, K. Induced pluripotent stem cells

generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. **Science**, v.321 (5893), p.1218-1221, 2008.

DIOSA-TORO, M.; ECHAVARRÍA-CONSUEGRA, L.; FLIPSE, J.; FERNÁNDEZ, G. J.; KLUIVER, J.; VAN DEN BERG, A.; URCUQUI-INCHIMA, S.; SMIT, J. M. MicroRNA profiling of human primary macrophages exposed to dengue virus identifies miRNA-3614-5p as antiviral and regulator of ADAR1 expression. **PLoS neglected tropical diseases**, 11(10), e0005981, 2017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005981>

DU, S.; LIU, Y.; LIU, J.; ZHAO, J.; CHAMPAGNE, C.; TONG, L. Aedes mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. **Nat. Commun.** 10 (1), 1324. 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09256-0>>.

DUFFY, M.; CHEN, T.; HANCOCK, T.; POWERS, A.; KOOL, J.; LANCIOTTI, R.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C.; GUILLAUMOT, L.; GRIGGS, A.; BEL, M.; LAMBERT, A. J.; LAVEN, J.; KOSOY, O.; PANELLA, A.; BIGGERSTAFF, B. J.; FISCHER, M.; HAYES, E. B. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v.360, p.2536-2543, 2009.

EBERT, A.D.; YU, J.; ROSE JR, F.F.; MATTIS, V.B.; LORSON C.V.; THOMSON, J.A.; SVENDSEN, C.V. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. **Nature**, n.457, p.277-280, 2009.

EICKMANN, S. H.; CARVALHO, M. D. C. G.; RAMOS, R. C. F.; ROCHA, M. A. W.; LINDEN, V. V. D.; SILVIA, P. F.S. Zika virus congenital syndrome. **Cadernos de Saúde Pública**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00047716>>

EBERLE, R. J.; OLIVIER, D. S.; PACCA, C. C.; AVILLA, C.; NOGUEIRA, M. L.; AMARAL, M. S.; WILLBOLD, D.; ARNI, R. K.; CORONADO, M. A. In vitro study of Hesperetin and Hesperidin as inhibitors of zika and chikungunya virus proteases. **PloS one**, 16(3), e0246319, 2021.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246319>

EPPE, C.; RAC, M.; DUNN, J.; VERSALOVIC, J.; MURRAY, K.O.; SUTER, M.A.; CORTES, M.S.; ESPINOZA, J.; SEFEROVIC, M.D.; LEE, W.; HOTEZ, P.; MASTROBATTISTA, J.; CLARK, S.L.; BELFORT, M.A.; AAGAARD, K.M. Testing for Zika virus infection in pregnancy: key concepts to deal with an emerging epidemic. *Am J Obstet Gynecol.* 216: 209–25, 2017.

FRANÇA, G.V.; SCHULER-FACCINI, L.; OLIVEIRA, W.K.; HENRIQUES, C.M.; CARMO, E.H.; PEDI, V.D.; NUNES, M.L.; CASTRO, M.C.; SERRUYA, S.; SILVEIRA, M.F.; BARROS, F.C.; VICTORA, C.G. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet*, v. 388, p. 891-897, 2016.

FERNANDES, I.R.; RUSSO, F.B.; PIGNATARI, G.C.; EVANGELINELLIS, M.M.; TAVOLARI, S.; MUOTRI, A.R.; BELTRÃO-BRAGA, P.C. Fibroblast sources: Where can we get them? *Cytotechnology*. v. 68, p. 223-8, 2016.

FIGUEIREDO, C.P.; BARROS-ARAGÃO, F.G.Q.; NERIS, R.L.S.; FROST, P.S.; SOARES, C.; SOUZA, I.N.O.; ZEIDLER, J.D.; ZAMBERLAN, D.C.; DE SOUSA, V.L.; SOUZA, A.S.; GUIMARÃES, A.L.A.; BELLIO, M.; MARCONDES DE SOUZA, J.; ALVES-LEON, S.V.; NEVES, G.A.; PAULA-NETO, H.A.; CASTRO, N.G.; DE FELICE, F.G.; ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; CLARKE, J.R.; DA POIAN, A.T.; FERREIRA, S.T. Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. *Nat Commun*. 2019 Sep 5;10(1):3890. doi: 10.1038/s41467-019-11866-7. PMID: 31488835; PMCID: PMC6728367.

FRANK, C.; CADAR, D.; SCHLAPHOF, A.; NEDDERSEN, N.; GÜNTHER, S.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; TAPPE, D. Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. *Eurosurveillance*, v.21(23), 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.23.30252>>. Acesso em: 07 de ago. 2016.

FRÉOUR, T.; MIRALLIÉ, S.; HUBERT, B.; SPLINGART, C.; BARRIÈRE, P.; MAQUART, M.; LEPARC-GOFFART, I. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. *Eurosurveillance*, v.21(23), 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.23.30254>>.

GATHERER, D.; KOHL, A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *J Gen Virol*, v.97, p. 269–73, 2016.

HAMEL, R.; DEJARNAC, O.; WICHIT, S.; EKCHARIYAWAT, P.; NEYRET, A.; LUPLERTLOP, N.; PERERA-LECOIN, M.; SURASOMBATPATTANA, P.; TALIGNANI, L.; THOMAS, F.; CAO-LORMEAU, V. M.; CHOUMET, V.; BRIANT, L.; DESPRÈS, P.; AMARA, A.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of virology*. 89(17), 8880–8896, 2015. <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15>

HAZIN, A. N.; PORETTI, A.; CRUZ, D. D. C. S.; TENORIO, M.; LINDEN, A. V. D.; PENA, L. J. P.; BRITO, C.; GIL, L. H. V.; MIRANDA-FILHO, D. B.; MARQUES, E. T.

A.; MARTELLI, C. M. T.; ALVES, J. G. B., HUISMAN, T. A. Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. **The New England Journal of Medicine**, v.374, p.2193-2195, 2016.

HARROWER, J.; KIEDRZYNSKI, T.; BAKER, S.; UPTON, A.; RAHNAMA, F.; SHERWOOD, J.; HUANG, Q. S.; TODD, A.; PULFORD, D. Sexual transmission of Zika virus and persistence in semen, New Zealand, 2016. **Emerging Infectious Diseases**, v.22 (10), 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid2210.160951>>.

HENRY, R. Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v.20, p.1090, 2014.

HUBER, S.; HETZER, B.; CRAZZOLARA, R.; ORTH-HÖLLER, D. The correct blood volume for pediatric blood cultures: a conundrum? **Clinical Microbiology and Infection**. 2019. doi:10.1016/j.cmi.2019.10.006

INOVIO PHARMACEUTICALS. Inovio Pharmaceuticals and GeneOne Life Science Receive Approval for First-in-Man Zika Vaccine Clinical Trial. Disponível em: <<http://ir.inovio.com/news/news-releases/news-releases-details/2016/Inovio-Pharmaceuticals-and-GeneOne-Life-Science-Receive-Approval-for-First-in-Man-Zika-Vaccine-Clinical-Trial/default.aspx>>.

KIM, Y.S.; ZHAO, J.; LIU, X.; FRASER, K.; LIN, L.; ZHANG, X.; ZHANG, F.; DORDICK, J.S.; LINHARDT, R.J. Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. **Biochemistry**, v. 56 (8), p.1151–1162, 2017.
KRATZ, A.; FERRANO, M.; SLUSS, P.M.; LEWANDROWSKI, K.B. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Laboratory reference values. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 15, p. 1548-63, 2004.

KUNO, G.; CHANG, G.J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol*. v.152, p. 687–696, 2007.

LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O.L.; LAVEN, J.J.; VELEZ, J.O.; LAMBERT, A.J.; JOHNSON, A.J.; STANFIELD, S.M.; DUFFY, M.R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 1232–1239, 2008.

LAROCCA, R. A.; ABBINK, P.; PERON, J. P.; ZANOTTO, P. M., IAMPIETRO, M. J.; BADAMCHI-ZADEH, A.; BOYD, M.; NG'ANG'A, D.; KIRILOVA, M.; NITYANANDAM, R.; MERCADO, N. B.; LI, Z.; MOSELEY, E. T.; BRICAULT, C. A.; BORDUCCHI, E. N.; GIGLIO, P. B.; JETTON, D.; NEUBAUER, G.; NKOLOLA, J. P.; MAXFIELD, L. F.; BARRERA, R. A.; JARMAN, R. G.; ECKELS, K. H.; MICHAEL, N. L., BAROUCH, D. H. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, 10.1038/nature18952 (2016). doi: <10.1038/nature18952 pmid:27355570>.

LEE, G.; PAPAPETROU, E.P.; KIM, H.; CHAMBERS, S.M.; TOMISHIMA, M.J.; FASANO, C.A.; GANAT, Y.M.; MENON, J.; SHIMIZU, F.; VIALE, A.; TABAR, V.; SADELAIN, M.; STUDER, L. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. **Nature**, v.461, n.7262, p.402-406, 2009.

LEFCORT, F.; MERGY, M.; OHLEN, S.B.; UEKI, Y.; GEORGE, L. Animal and cellular models of familial dysautonomia. **Clinical Autonomic Research**, 2017. doi: <doi:10.1007/s10286-017-0438-2>. Acesso em: 07/07/2017.

LUCAS, C.G.O.; KITOKO, J.Z.; FERREIRA, F.M.; SUZART, V.G.; PAPA, M.P.; COELHO, S.V.A.; CAVAZZONI, C.B.; PAULA-NETO, H.A.; OLSEN, P.C.; IWASAKI, A.; PEREIRA, R.M.; PIMENTEL-COELHO, P.M.; VALE, A.M.; DE ARRUDA, L.B.; BOZZA, M.T. Critical role of CD4⁺ T cells and IFN γ signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. **Nat Commun.** v.9, n. 1, p.3136, 2018. doi: 10.1038/s41467-018-05519-4.

LEWINSOHN, E.; BRITSCH, L.; MAZUR, Y.; GRESSEL, J. Flavanone Glycoside Biosynthesis in Citrus: Chalcone Synthase, UDP-Glucose:Flavanone-7-O-Glucosyl-Transferase and -Rhamnosyl-Transferase Activities in Cell-Free Extracts. *Plant physiology*, 91(4), 1323–1328, 1989. <https://doi.org/10.1104/pp.91.4.1323>

LI, X.; CHAUHAN, A.; SHEIKH, A. M.; PATIL, S.; CHAUHAN, V.; LI, X. M.; JI, L.; BROWN, T.; MALIK, M. Elevated immune response in the brain of autistic patients. **Journal of neuroimmunology**, 207(1-2), 111–116, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.002>>.

LIMONTA, D.; JOVEL, J.; KUMAR, A.; AIRO, A.M.; HOU, S.; SAITO, L.; BRANTON, W.; KA-SHU WONG, G.; MASON, A.; POWER, C.; HOBMAN, T.C. Human Fetal Astrocytes Infected with Zika Virus Exhibit Delayed Apoptosis and Resistance to Interferon: Implications for Persistence. **Viruses**. 2018 Nov 17;10(11):646. doi: 10.3390/v10110646. PMID: 30453621; PMCID: PMC6266559.

LOGAN, S.; ARZUA, T.; CANFIELD, S. G.; SEMINARY, E. R.; SISON, S. L.; EBERT, A. D.; BAI, X. Studying Human Neurological Disorders Using Induced Pluripotent Stem Cells: From 2D Monolayer to 3D Organoid and Blood Brain Barrier Models. **Comprehensive Physiology**, 9(2), 565–611, 2019. <https://doi.org/10.1002/cphy.c180025>

MACNAMARA, F.N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 48, p. 139-145, 1954.

MANSUY, J. M.; DUTERTRE, M.; MENGELLE, C.; FOURCADE, C.; MARCHOU, B.; DELOBEL, P.; IZOPET, J.; MARTIN-BLONDEL, G. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen?. **The Lancet Infectious Diseases**, v.16(4), p.405, 2016.

MARCHETTO, M.C.; CARROMEU, C.; ACAB, A.; YU, D.; YEO, G.W.; MU, Y.; CHEN, G.; GAGE, F.H.; MUOTRI, A.R. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. **Cell**. 143(4):527-39, 2010. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.016. PMID: 21074045; PMCID: PMC3003590.

MARCHETTO, M. C.; BELINSON, H.; TIAN, Y.; FREITAS, B. C.; FU, C.; VADODARIA, K.; BELTRAO-BRAGA, P.; TRUJILLO, C. A.; MENDES, A.; PADMANABHAN, K.; NUNEZ, Y.; OU, J.; GHOSH, H.; WRIGHT, R.; BRENNAND, K.; PIERCE, K.; EICHENFIELD, L.; PRAMPARO, T.; EYLER, L.; BARNES, C. C.; MUOTRI, A. R. Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. **Molecular psychiatry**, 22(6), 820–835, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/mp.2016.95>>.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. F. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by Aedes (Stegomyia) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49, p.4-10, 2015

MATUSALI, G.; HOUZET, L.; SATIE, A.P.; MAHÉ, D.; AUBRY, F.; COUDERC, T.; FROUARD, J.; BOURGEAU, S.; BENSALAH, K.; LAVOUÉ, S.; JOGUET, G.; BUJAN, L.; CABIÉ, A.; AVELAR, G.F.; LECUIT, M.; TORTOREC, A.L.; DEJUCQ-RAINSFORD, N. Zika virus infects human testicular tissue and germ cells. **J Clin Invest**. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/JCI121735>>.

MENGESHA TSEGAYE, M.; BEYENE, B.; AYELE, W.; ABEBE, A.; TAREKE, I.; SALL, A. Sero-prevalence of yellow fever and related Flavi viruses in Ethiopia: a public health perspective. **BMC Publ. Health** 18 (1), 1011. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12889-018-5726-9>>.

MLAKAR, J.; KORVA, M.; TUL, N.; POPOVIC, M.; POLJSK-PRIJATELJ, M.; MRAZ, J.; KOLENC, M.; RUS, K. R.; VIPOTNIK, T. V.; VODUSEK, V. F.; VIZJAK, A.; PIZEM, J.; PETROVEC, M.; ZUPANC, T. A. Zika Virus Associated with Microcephaly. **The New England Journal of Medicine**, v.374, p.951-958, 2016.

MEITAL, L. T.; COWARD, A. S.; WINDSOR, M. T.; BAILEY, T. G.; KUBALLA, A.; RUSSELL, F. D. A simple and effective method for the isolation and culture of human monocytes from small volumes of peripheral blood. **Journal of Immunological Methods**. 2019. doi:10.1016/j.jim.2019.04.005

MELO, A. S. O.; MALINGER, G.; XIMENES, R.; SZEJNFELD, P. O.; SAMPAIO, A. S.; FILIPPIS, A. M. B. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v.47, p.6-7, 2016

MENGESHA, T.; MAKONNEN, E. Comparative efficacy and safety of chloroquine and alternative antimalarial drugs: a meta-analysis from six African countries. **East African medical journal**, 76(6), 314–319, 1999.

MESCI, P.; MACIA, A.; MOORE, S.M.; SHIRYAEV, S.A.; PINTO, A.; HUANG, C.; TEJWANI, L.; FERNANDES, I.R.; SUAREZ, N.A.; KOLAR, M.J.; MONTEFUSCO, S.; ROSENBERG, S.C.; HERAI, R.H.; CUGOLA, F.R.; RUSSO, F.B.; SHEETS, N.; SAGHATELIAN, A.; SHRESTA, S.; MOMPER, J.D.; SIQUEIRA-NETO, J.L.; CORBETT, K.D.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B.; TERSKIKH, A.V.; MUOTRI, A.R. Blocking Zika virus vertical transmission. **Scientific Reports**, v.8, 1218, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SVS monitora casos de doença exantemática no Nordeste. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/noticias/svs/17524-svs-monitora-casos-de-doenca-exantematica-no-nordeste> >.

MOREIRA, J.; PEIXOTO, T.M.; SIQUEIRA, A.M.; LAMAS, C.C. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clin Microbiol Infect** 2017; DOI:10.1016/j.cmi.2016.12.027.

MUFFAT, J.; LI, Y.; OMER, A.; DURBIN, A.; BOSCH, I.; BAKIASI, G.; RICHARDS, E.; MEYER, A.; GEHRKE, L.; JAENISCH, R. Human induced pluripotent stem cell-derived glial cells and neural progenitors display divergent responses to Zika and dengue infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 115(27), 7117–7122, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1073/pnas.1719266115> >.

MUÑOZ, L.S.; BARRERAS, P.; PARDO, C.A. Zika Virus-Associated Neurological Disease in the Adult: Guillain-Barré Syndrome, Encephalitis, and Myelitis. **Semin Reprod Med**. v. 34, p. 273-279, 2016.

MURAKAMI, E.; TOLSTYKH, T.; BAO, H.; NIU, C.; STEUER, H.M.M.; BAO, D.; CHANG, W.; ESPIRITU, C.; BANSAL, S.; LAM, A.M.; OTTO, M.J.; SOFIA, M.J.; FURMAN, P.A. Mechanism of activation of PSI-7851 and its diastereoisomer PSI-7977. **J Biol Chem**, v.285, p.34337–34347, 2010. DOI: 10.1074/jbc.M110.161802

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. NIH Begins Testing Investigational Zika Vaccine in Humans. Disponível em: <<https://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2016/Pages/Zika-Investigational-Vaccine.aspx>>.

NIELSEN-SAINES, K.; BRASIL, P.; KERIN, T.; VASCONCELOS, Z.; GABAGLIA, C.R.; DAMASCENO, L.; PONE, M.; CARVALHO, L.M.A.; PONE, S.M.; ZIN, A.A.; TSUI, I.; SALLES, T.R.S.; CUNHA, D.C.; COSTA, R.P.; MALACARNE, J.; REIS, A.B.; HASUE, R.H.; AIZAWA, C.Y.P.; GENOVESI, F.F.; EINSPIELER, C.; MARSCHIK, P.B.; PEREIRA, J.P.; GAW, S.L.; ADACHI, K.; CHERRY, J.D.; XU, Z.; CHENG, G.; MOREIRA, M.E. Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children. **Nat Med** 25, 1213–1217, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0496-1>>.

NOWAKOWSKI, T. J.; POLLEN, A. A.; LULLO, E.; SANDOVAL-ESPINOSA, C.; BERSHTEYN, M.; KRIEGSTEIN, A. R. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v.18(5), p.591-596, 2016.

OLAGNIER, D.; MUSCOLINI, M.; COYNE, C. B.; DIAMOND, M. S.; HISCOTT, J. Mechanisms of Zika Virus Infection and Neuropathogenesis. **DNA and cell biology**. 35(8), 367–372, 2016. <https://doi.org/10.1089/dna.2016.3404>

OLIVEIRA, W.K.; ESCALANTE, J.C.; OLIVEIRA, W.T.G. H.; CARMO, G.M.I.; HENRIQUES, C.M.P.; COELHO, G.E.; FRANÇA, G.V.A. Increase in reported prevalence of microcephaly in infants born to women living in areas with confirmed Zika virus transmission during the first trimester of pregnancy—Brazil, 2015. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 2016; 65: 242–47.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Countries and territories with autochthonous transmission in the Americas reported in 2015-2016. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11603&Itemid=41696&lang=en>.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Timeline of Emergence of Zika virus in the Americas. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11959&Itemid=41711&lang=en>.

PARPURA, V.; BASARSKY, T. A.; LIU, F.; JEFTINIJA, K.; JEFTINIJA, S.; HAYDON, P. G. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature**, 369(6483), 744–747, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/369744a0>>.

PENOT, P.; BRICHLER, S.; GUILLEMINOT, J.; LASCOUX-COMBE, C.; TAULERA, O.; GORDIEN, E.; LEPARC-GOFFART, I.; MOLINA, J. Infectious Zika virus in vaginal secretions from an HIV-infected woman, France, 2016. **Euro Surveill** 2017; 22: 30444.

PERERA-LECOIN, M.; MEERTENS, L.; CARNEC, X.; AMARA, A. Flavivirus entry receptors: An update. **Viruses**, v.6, p.69-88, 2013.

PEREZ, S.; KASPI, A.; DOMOVITZ, T.; DAVIDOVICH, A.; LAVI-ITZKOVITZ, A.; MEIRSON, T.; ALISON HOLMES, J.; DAI, C. Y.; HUANG, C. F.; CHUNG, R. T.; NIMER, A.; EL-OSTA, A.; YAARI, G.; STEMMER, S. M.; YU, M. L.; HAVIV, I.; GALTANAMY, M. Hepatitis C virus leaves an epigenetic signature post cure of infection by direct-acting antivirals. **PLoS genetics**, 15(6), e1008181, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008181>

PHATNANI, H.; MANIATIS, T. Astrocytes in neurodegenerative disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 7(6), a020628. 2015. Disponível em <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020628>

POTIER, B.; BILLARD, J. M.; RIVIÈRE, S.; SINET, P. M.; DENIS, I.; CHAMPEIL-POTOKAR, G.; GRINTAL, B.; JOUVENCEAU, A.; KOLLEN, M.; DUTAR, P. Reduction in glutamate uptake is associated with extrasynaptic NMDA and metabotropic glutamate receptor activation at the hippocampal CA1 synapse of aged rats. **Aging cell**, 9(5), 722–735, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00593.x>

QIAN, X.; NGUYEN, H.N.; SONG, M.M.; HADIONO, C.; OGDEN, S.C.; HAMMACK, C.; YAO, B.; HAMERSKY, G.R.; JACOB, F.; ZHONG, C.; YOON, K.; JEANG, W.; LIN, L.; LI, Y.; THAKOR, J.; BERG, D.A.; ZHANG, C.; KANG, E.; CHICKERING, M.; NAUEN, D.; HO, C.; WEN, Z.; CHRISTIAN, K.M.; SHI, P.; MAHER, B.J.; WU, H.; JIN, P.; TANG, H.; SONG, H.; MING, G. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. **Cell**, v.165, p.1238–1254, 2016.

QIAN, X.; NGUYEN, H. N.; JACOB, F.; SONG, H.; MING, G. L. Using brain organoids to understand Zika virus-induced microcephaly. **Development** (Cambridge, England), 144(6), 952–957. 2017. Disponível em <https://doi.org/10.1242/dev.140707>.

SARNO, M.; SACRAMENTO, G.A.; KHOURI, R.; ROSÁRIO, M.S.; COSTA, F.; ARCHANJO, G.; SANTOS, L.A.; NERY, N.; VASILAKIS, N.; KO, A.I.; ALMEIDA, A.R.P. Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis,

Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 10, n. 2.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004517>

SÜDHOF, T. C. Towards an Understanding of Synapse Formation. **Neuron**, 100(2), 276–293, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.040>>

RUSO, F.B.; FREITAS, B.C.; PIGNATARI, G.C.; FERNANDES, I.R.; SEBASTIÃO, J.; MUOTRI, A.R.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B. Modeling the Interplay Between Neurons and Astrocytes in Autism Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Biol Psychiatry**. v. 83, p. 569-578, 2018.

SAXENA, S. K.; ELAHI, A.; GADUGU, S.; PRASAD, A. K. Zika virus outbreak: an overview of the experimental therapeutics and treatment. **Virus Disease**, v.27, p.111-115, 2016.

SCHWARTZ, D. A. Autopsy and postmortem studies are concordant: pathology of Zika virus infection is neurotropic in fetuses and infants with microcephaly following transplacental transmission. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.141(1), p.68-72, 2017.

SHARMA, S.; TANDEL, K.; DASH, P.K.; PARIDA, M. M. Zika virus: A public health threat. **Journal of Medical Virology**, doi:10.1002/jmv.24822

SILVA, L.R.C.; SOUZA, A.M. Zika virus: what do we know about the viral structure, mechanisms of transmission, and neurological outcomes?. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.49(3), p.267-273, 2016.

SIMPSON, J.E.; INCE, P.G.; LACE, G.; FORSTER, G.; SHAW, P.J.; MATTHEWS, F.; SAVVA, G.; BRAYNE, C.; WHARTON, S.B.; FUNCTION, M.R.C.C. Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. **Neurobiol Aging** 31: 578–590. 2010.

SIROHI, D.; CHEN, Z.; SUN, L.; KLOSE, T.; PIERSON, T. C.; ROSSMANN, M. G.; KUHN, R. J. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v.351, p.1-7, 2016.

SOFIA, M.J.; BAO, D.; CHANG, W.; DU, J.; NAGARATHNAM, D.; RACHAKONDA, S.; REDDY, P.G.; ROSS, B.S.; WANG, P.; ZHANG, H-R.; BANSAL, S.; ESPIRITU, C.; KEILMAN, M.; LAM, A.M.; STEUER, H.M.M.; NIU, C.; OTTO, M.J.; FURMAN, P.A. Discovery of a β -d-2'-Deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine Nucleotide Prodrug

(PSI-7977) for the Treatment of Hepatitis C Virus. **J Med Chem**, v. 53, p.7202–7218, 2010. DOI:10.1021/jm100863x

SOUSA, P. S.; MELO, L. S. S.; BARROS, E. C. C. S.; LAJUS, T.; RIBEIRO, B. F. R.; SILVA, L. C. S.; COLONELLI, G.; BUENO, L. S. M.; ACOSTA, A. X.; MEIRA, J. G. C.; SARNO, M.; GIULIANI, L.; PACHECO, C. A. M. S.; BARBOSA, C. N.; PONE, S. M.; CORREIA, P. S.; MORON, A. F.; SANTOS, A. M. N.; PEREZ, A. B. A.; MAIA, R. E.; FERRAZ, V. E. F.; RANIERI, T. M. S.; SILVA, A. A.; VIANNA, F. S. L.; ABECHÉ, A.; LEITE, J. C. L.; LARRANDABURU, M. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **Centers for Disease Control and Prevention**, v.65(3), p.59-62, 2016.

TALANTOVA, M.; SANZ-BLASCO, S.; ZHANG, X.; XIA, P.; AKHTAR, M. W.; OKAMOTO, S.; DZIEWCZAPOLSKI, G.; NAKAMURA, T.; CAO, G.; PRATT, A. E.; KANG, Y. J.; TU, S.; MOLOKANOVA, E.; MCKERCHER, S. R.; HIRES, S. A.; SASON, H.; STOUFFER, D. G.; BUCZYNSKI, M. W.; SOLOMON, J. P.; MICHAEL, S.; LIPTON, S. A. $\text{A}\beta$ induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110(27), E2518–E2527, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306832110>

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v.131, n.5, p.861-872, 2007.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; OLIVEIRA, W.K.; NUNES, M.L.; RODRIGUES L.C. The Epidemic of Zika Virus–Related Microcephaly in Brazil: Detection, Control, Etiology, and Future Scenarios. **American Journal of Public Health**, v.106, p. 601-605, 2016.

VAN DER LINDEN, V.; PESSOA, A.; DOBYNS, W.; BARKOVICH, A.J.; JÚNIOR, H.V.; FILHO, E.L.; RIBEIRO, E.M.; LEAL, M.C.; COIMBRA, P.P.; ARAGÃO, M.F.; VERÇOSA, I.; VENTURA, C.; RAMOS, R.C.; CRUZ, D.D.; CORDEIRO, M.T.; MOTA, V.M.; DOTT, M.; HILLARD, C.; MOORE, C.A. Description of 13 Infants Born During October 2015-January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil. **Morbidity and Mortality Weekly Report - CDC**, v. 65, p.1343-1348, 2016.

VERKHRATSKY, A.; NEDERGAARD, M. Physiology of Astroglia. **Physiological reviews**, 98(1), 239–389, 2018. Disponível em <<https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>>.

VIANNA, P.; GOMES, J.; BOQUETT, J. A.; FRAGA, L. R.; SCHUCH, J. B.; VIANNA, F.; SCHULER-FACCINI, L. Zika Virus as a Possible Risk Factor for Autism Spectrum Disorder: Neuroimmunological Aspects. **Neuroimmunomodulation**. 25(5-6), 320–327, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000495660>>.

WHO, 2018. Cases of Zika Virus Disease by Country or Territory.

WHO, 2019. Countries-With-Zika-and-Vectors-Table.

WHOa, 2019. zika-epidemiology-update-july-2019.

YU, J.; HU, K.; SMUGA-OTTO, K.; TIAN, S.; STEWART, R.; SLUKVIN, I.I.; THOMSON, J.A. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. **Science**. 2009 May 8;324(5928):797-801. doi: 10.1126/science.1172482. Epub 2009 Mar 26. PMID: 19325077; PMCID: PMC2758053.

ANEXO A – Artigo publicado na revista “Expert Opinion on Drug Discovery” intitulado “Developing animal models of Zika virus infection for novel drug discovery”

EXPERT OPINION ON DRUG DISCOVERY
https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1597050

REVIEW

Developing animal models of Zika virus infection for novel drug discovery

Cristine Marie Yde Ohki^a, Cecilia Benazzato^{a,b}, Fabiele Baldino Russo^a and Patricia Cristina Baleeiro Beltrão-Braga^a

^aDepartment of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^bDepartment of Surgery, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Just before the Brazilian outbreak, Zika virus was related to a mild infection, causing fever and skin rash. Congenital Zika Syndrome was first described in Brazil, causing microcephaly and malformations in newborns. Three years after the outbreak, the mechanisms of Zika pathogenesis are still not completely elucidated. Moreover, as of today, there is still no approved vaccine that can be administered to the susceptible population. Considering the unmet clinical need, animal models represent an unprecedented opportunity to study Zika pathophysiology and test drugs for the treatment and prevention of vertical transmission.

Areas covered: The authors explore the current knowledge about Zika through animal models and advancements in drug discovery by highlighting drugs with the greatest potential to treat ZIKV infection and block vertical transmission.

Expert opinion: Some drugs used to treat other infections have been repurposed to treat Zika infection, reducing the cost and time for clinical application. One promising example is Sofosbuvir, which protected mice models against Zika pathogenesis by preventing vertical transmission. Importantly, there is a lack on exploration on the long-term effects of Zika Congenital Syndrome, as well as the possible ways to treat its sequelae.

ARTICLE HISTORY

Received 10 December 2018
Accepted 15 March 2019

KEYWORDS

Animal model; azithromycin; chloroquine; congenital Zika syndrome; drug discovery; galidesivir; niclosamide; novobiodin; sofosbuvir; ZIKV

1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus from the Flaviviridae family that was first isolated in 1947 from a blood sample of a rhesus monkey captured at the Zika forest, in Uganda. Although ZIKV is transmitted principally by *Aedes* genus mosquitos, vertical (maternal to fetal) and sexual transmissions have been reported [1,2].

Epidemics of ZIKV were reported in the Yap Islands of Micronesia and in French Polynesia. Clinical signs of infection were characterized as mild fever, cutaneous rash, malaise and red eyes [3–5]. However, apart from the mentioned clinical signs described before, Brazil had an outbreak with the first cases of newborns with microcephaly related to ZIKV infection during pregnancy. The Congenital Zika Syndrome (CZS) consists of a large spectrum of neurologic abnormalities including microcephaly and other fetal malformations, like brain calcifications, ventriculomegalia, lissencephaly, hydrocephalus, polymicrogyria and holoprosencephaly [6]. Besides that, ZIKV infection has been related to meningoencephalitis and other manifestations that are mediated by the immune system, such as acute myelitis and Guillain-Barré syndrome [7,8].

Currently, there is still no established treatment or vaccine for ZIKV infection. Consequently, the development of animal models that exhibit ZIKV infection represents important tools to understand ZIKV pathophysiology, support insights about

the immunological response against the virus and are useful as potential instruments for screening therapeutic approaches including vaccines.

This manuscript is a narrative review of the state-of-the-art animal models used to study the pathogenesis of ZIKV as well as for novel drug discovery and development; drugs highlighted including those which prevent ZIKV pathogenesis and vertical transmission.

2. Rodents used to study ZIKV pathogenesis

2.1. Mice models

The use of small animals as models for Zika virus infection has been valuable to understand the pathogenesis of virus strains (Table 1) with mice being the most popular [9–14]. The first work that investigated the relationship between ZIKV infection and CZS used two immunocompetent mice lineages, the SJL, and C57BL/6. In this study, pregnant mice were intravenously infected by the Brazilian-ZIKV strain, following the gestation until pup's natural birth delivery. After birth, the pups from SJL revealed that ZIKV was able to cross the placental membrane (Table 2). Furthermore, general tissue analyses showed that although ZIKV infected many tissues, the number of viral particles were much higher in brain tissue, revealing that ZIKV to be neurotropic. In addition, brain samples unveiled misregulation in genes associated with apoptosis and

CONTACT Patricia Cristina Baleeiro Beltrão-Braga ✉ patricia.cbbraga@usp.br ✉ Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Butanta, São Paulo - SP, 05508-900 - 2nd floor - room 227. Cidade Universitária, São Paulo 05508-900, SP, Brazil

Cristine and Cecilia contributed equally to this work

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Article highlights

- Mice models have been very powerful tools to understand ZIKV mechanism of pathogenesis, as well as for drug screening;
- Signs of ZIKV pathogenesis differs depending on the animal model and species, routes of viral administration and viral strain;
- Although drugs against ZIKV have been widely explored *in vitro*, there are still few drugs tested *in vivo*;
- The use of monkeys as animal models to test anti-ZIKV drugs is also encouraging;
- Sofosbuvir is a FDA-approved drug that can prevent ZIKV infection in adults and blocks ZIKV vertical transmission.

This box summarizes key points contained in the article.

autophagy. On the other hand, C57BL/6 was resistant to ZIKV vertical transmission, with no signs of viral pathogenesis nor viral RNA in pup's tissues, which showed that the genetic background and mother's immunological response against ZIKV could be also considered for vertical transmission (Table 2) [9]. Moreover, a study comparing susceptibility to ZIKV infection in immunocompetent adult mice revealed that both BALB/c and SJL mice had a significantly higher viremia compared to C57BL/6 mice [15]. *In vivo* results, in addition to evidence acquired using Central Nervous System (CNS) cells *in vitro*, confirmed that ZIKV was responsible for the CZS found in newborns during the Brazilian outbreak in 2015 [9,16–21].

However, although the pups presented the CZS, microcephaly, the first sign of congenital ZIKV infection in human newborns, was less evident in mice. Studies examining genes related to microcephaly have shown milder phenotypes in mice compared with humans [22,23]. The direct injection of SZ01-Asian ZIKV strain in lateral ventricles of ICR mice fetuses caused marked deregulation of microcephaly associated genes, cortical thinning and induction of an immune response in the brain, with the highest ZIKV titers in neural progenitor cells, but microcephaly *per se* was not visualized [24]. Moreover, using the same protocol, but injecting together serum from a convalescent ZIKV infected human, a reduction in the number of ZIKV infected cells was

observed, suggesting a decrease in ZIKV teratogenic effects [25]. Another observation endorses the absence of noticeable microcephaly in mice, taking into account the difference in the number of radial glial cells between mice and humans [26]. Maternally infected ZIKV demonstrated that the virus crosses the placenta and infects radial glial cells in developing brains, decreasing the number of neural progenitors and causing brain malformation, still without evidence of microcephaly [27].

Engineered mouse models, like double knockouts to receptors for the type I (IFNAR1) and type II (IFNGR1) interferons, were also important models for the better comprehension of the defense mechanisms against viral infection [28–30]. Indeed, knockout mice for type-I interferon receptors (IFN α /B) had been previously described as models of disease to Dengue [31–34] and Yellow Fever viruses [35], which are also from the Flaviviridae family. Several knockout mice lineages with alterations in both type I or II interferons, like B6 129, IFNAR1 $^{-/-}$, Irf3 $^{-/-}$ Irf5 $^{-/-}$ Irf7 $^{-/-}$ (interferon regulatory factor triple-knockout mice) and Irf3 $^{-/-}$ and Irf5 $^{-/-}$, both single-knockout mice, were used to investigate ZIKV pathogenesis providing notable findings. These mice were infected with both French Polynesian and African ZIKV strains. When infected with H/PF/2013- French Polynesian ZIKV strain, the AG129, a knockout mouse for both type I (IFN α /B) and type II (IFN γ) interferon receptors, IFNAR1 $^{-/-}$ and triple-knockout mice displayed neurological signs. Interestingly, IFNAR1 $^{-/-}$ mice were less affected when infected with MR-766 – African ZIKV (Table 2). It is worth mentioning that additional experiments with the following mice lineages reported no adverse outcomes: Mavs $^{-/-}$, Irf3 $^{-/-}$, Irf5 $^{-/-}$, Ifnlr1 $^{-/-}$, Ifit1 $^{-/-}$, Ifit2 $^{-/-}$, Ifitm3 $^{-/-}$, Isg15 $^{-/-}$, Ube1l $^{-/-}$, Mb21d $^{-/-}$, and Tmem173 $^{-/-}$ (STING) [36]. In another independent study using the H/PF/2013-ZIKV strain, transplacental infection of B6 IFNAR1 $^{-/-}$ resulted in fetal demise and intrauterine growth restriction of the embryos, with high viral loads in the fetal brain. In the same study, anti-IFNAR antibody against ZIKV was administered in infected B6 WT, resulting in mild intrauterine growth restriction of the embryos, but without evidence of fetal demise, reflecting the role of interferon on ZIKV pathogenesis [37].

Table 1. Zika strains used in animal models.

Strain	Subtype/Genotype	GenBank Sequence	Local/Year	Sequence Length	Description	Reference
Brazil ZKV 2015	Asian	KU497555	Paraiba, Brazil/2015	10,793	Isolated from a human case in a state of Paraiba, Brazil, in 2015.	10
H/PF/2013	Asian	KJ776791	French Polinesia/2013	10,807	Isolated from human.	46
MP1751	African	KY288905	Uganda/1962	10,752	Isolated from <i>Aedes africanus</i> .	11
Dakar 1984-ZIKV	African	KX601166	Senegal/1984	10,771	Isolated from <i>Aedes africanus</i> .	46
SMGC1	Asian	KX266255	China/2016	10,785	Isolated from serum of a case returning to China from Fiji.	47
FSS13025	Asian	JN860885	Cambodia/2010	10,296	Isolated after passage from Vero African green monkey kidney cells 1 time.	12
Paraiba 2015 – ZIKV	Asian	KX280026	Brazil/2015	10,807	Isolated from human serum.	37
MR-766	African	KX377335	Uganda/1947	10,807	Isolated from <i>Macaca mulatta</i> (monkey)	36
GZ01	Asian	KU820898	China/2016	10,272	Isolated from human urine.	61
PRVABC59	Asian	KU501215	Puerto Rico/2015	10,675	Isolated from human.	63
ArD41,525	African	KU955591	Senegal/1984	10,806	Isolated from <i>Aedes africanus</i> .	73
CPC-0740	Asian	KU681082	Philippines/2012	10,807	Isolated from human.	73
P6-740	Asian	HQ234499	Malaysia/1966	10,807	Isolated from <i>Aedes aegypti</i> .	72
MEXI-44	Asian	KY606272	Mexico/2016	10,794	Isolated from human.	74

Table 2. Mouse models used of exploring ZIKV pathogenicity. IV: Intravenous; ID: Intradermal; IP: Intraperitoneal; IC: Intracerebral; IT: Intrastriate; SC: Subcutaneous.

Mouse model	Mouse model description	ZIKV strain	Route of viral administration	Outcome	References
SJL	Immunocompetent, decrease on NK activity and high levels of circulating T cells.	Brazil ZIKV2015	IV	Intrauterine growth restriction, brain malformations, decrease in cortical thickness.	10
C57BL/6	Sensitive to pain and cold and has a weakened immune system.	Brazil ZIKV2015 H/PF/2013-ZIKV, 1984-ZIKV SMGC1	IV ID IP/IT	None. Changes in architecture and testicular size. Epididymitis and orchitis. No lesion in prostate and seminal vesicles.	10 46 47
AG129	Increased susceptibility to viral infections. Interferon alpha/beta/gamma receptor null.	H/PF/2013	IV	Neurologic signs. Hind limb weakness and paralysis. No neurologic signs. Weight loss, hunched posture and lethargy.	36 104
IFNAR1 ^{-/-}	Lack type-I interferon receptor function, reduced immune response and increased susceptibility to viral infection.	FSS13025 Paraba 2015-ZIKV H/PF/2013 MR-766	SC IP IV	Severe neurological signs. Death. Neurologic signs. Hind limb weakness and paralysis.	12 37 36
lrf3 ^{-/-} lrf5 ^{-/-} lrf7 ^{-/-}	Deletion of lrf3, lrf5 and lrf7 genes. Increased susceptibility to viral infections. Interferon alpha/beta receptor null.	SMGC1 H/PF/2013 FSS13025	IP/IT IV SC	Reduction in clinical signs and lethality. 20% of lethality. Epididymitis and orchitis. Neurologic signs. Hind limb weakness and paralysis. Higher lethality rates in young mice.	36 47 36 12
Swiss BALB/c	Versatile outbred mouse, used in many areas of biomedical research. Mutation at Foxn1 gene, blocking thymus-derived T cells. High activated NK cells.	MR-766 GZ01	SC IP	Seizures, neurodegeneration and brain calcifications. Severe neurological symptoms. Hind limb weakness and paralysis.	55 61
ICR suckling mice model	Carry recessive mutation in gene Pds6b ^{rd1}	MR-766	IC/IP	High mortality rate. Body weight loss, ruffled fur, lethargy, severe ataxia and limb paralysis.	62
BALB/C immunosuppressed	Mutation at Foxn1 gene, blocking thymus-derived T cells. High activated NK cells.	PRVABC59	IP	Body weight loss with high mortality rate.	63

Pathogenesis of ZIKV infection was also studied in young adult mice models, revealing that the age of the host could be relevant for ZIKV pathogenesis. A study with A129 type-I interferon receptors (IFN α/β) and FSS13025-Asian ZIKV strain disclosed that young mice presented similar signs of illness to older animals, but with higher lethality rates (Table 2) [11]. With the same mice model, but this time infected with MP1751-African ZIKV strain, lesions were mainly located in the CNS and spleen, while no clinical phenotype and decreased viral load observed in the control 129Sv/Ev [10].

AG129 mice with ZIKV revealed similar lethality [11] as observed before to other arboviruses, like the Japanese encephalitis virus [38], Congo hemorrhagic fever virus [39,40] and O'nyong-nyong virus [41,42]. In this work, when AG129 was infected, worsening of neurological signs were observed (Table 2) [11]. Analysis of the tissues from both A129 and AG129 mice demonstrated that the highest viral loads were located in the testes and brain. The presence of virus in the testes is consistent with the reports in human literature of ZIKV sexual transmission [43,44]. In contrast, another study using AG129 mice, but the H/PF/2013-ZIKV, described signs of illness, but no signs of neurological impairment. According to the authors, the difference of ZIKV pathogenesis could be related to the different ZIKV's strains used [12]. In complement with that, the amount of virus may determine the development of the clinical outcome, as revealed by another study using AG129 mice infected with the MR-766 ZIKV strain [45].

ZIKV was also found in the reproductive tract of males, showing that this system is susceptible and permissible to this virus. In a study with C57BL/6 mice treated with IFNAR1-blocking antibody prior to infections with H/PF/2013-ZIKV or the 1984 – Senegal ZIKV strain, ZIKV RNA was detected in testis, epididymis, and related fluids, with signs of disease especially the case of the 1984-ZIKV strain (Table 2). The experiment was repeated in Rag1^{-/-}, homozygous mutant mice that do not produce T and B mature cells. Similar lesions were observed, but with less damage in Leydig cells [46]. Using the SMGC1 – Asian ZIKV strain, IFNAR1^{-/-} and C57BL/6 models also had signs of infection in the reproductive male tract, with IFNAR1^{-/-} being more susceptible to death (Table 2) [47].

The reproductive tract of females was also an object of investigation for ZIKV pathogenesis. A study using the FSS13025-ZIKV strain inoculated intravaginally compared clinical signs of infection between AG129 and LysMCre + IFNAR1^{fl/fl} mice, which lacks IFNAR in myeloid cells, with AG129 being more affected [48]. Interestingly, this was observed only when the mice were inoculated during induced diestrus, until 10 days post infection (d.p.i.) in vaginal washes, indicating that the virus may replicate in the vaginal mucosa [48]. In another study, the same ZIKV strain (FSS13025) and C57BL/6 mice indicated that viral RNA persisted in the vagina until 4 days after intravaginal inoculation [49]. These results were compared with those from several mice knockout lineages, like in Rag2^{-/-} mice, with no differences compared to WT regarding vaginal viral RNA load. However, in IFNAR1^{-/-} and lrf3^{-/-} lrf7^{-/-} mice, increased viral RNA levels was detected intravaginally, with mice lethality achieved at 9 d.p.i. if high-doses (5.2 x 10⁵ p.f.u.) of virus were inoculated [49], corroborating with other studies [10–13,36,37,45,47].

Since ZIKV also causes eye pathology in CZS patients [6,50,51], the presence of virus in the eye was also investigated. IFNAR1^{-/-} mice infected with the Paraiba 2015 – Brazilian ZIKV strain, unloaded viral RNA in tears until 7 d.p.i. [52]. To determine the infectious capability of ZIKV in tears, ocular secretions and eye tissue homogenates were injected intraperitoneally into AG129 mice. Mice infected with ocular homogenates collected 7 d.p.i. died. On the other hand, mice infected with ocular homogenates collected 28 d.p.i. or with tears collected 7 d.p.i. did not present any clinical signs of infection, revealing that there is an acute phase of viral production in the eye (Table 2) [52].

This extensive characterization of ZIKV pathogenesis in mice permitted drug testing against ZIKV and established mice models to test compounds against ZIKV infection. An α -helical peptide (AH) was tested in A129 infected with the HS-2015-BA-01-Brazilian ZIKV strain. AH was able to penetrate the blood-brain barrier (BBB), decreasing secretion of proinflammatory cytokines and microglial infiltration (Table 3) (Figure 1) [53]. NITD008, an adenosine analog that inhibits the viral RNA-dependent RNA polymerase, was tested in A129 mice infected with the GZ01–Asian ZIKV strain. In this study, serum viremia was reduced after oral administration of the drug, thus preventing animal death (Table 3) (Figure 1) [54]. Another inhibitor of viral RNA-dependent RNA polymerase, 7DMA, was tested in AG129 infected with the H/PF/2013-ZIKV strain, delaying the course of the disease. The results were even better treating SCID mice (Table 3) (Figure 1) [45].

Drugs to avoid short and long-term neuropathological consequences and behavioral changes of CZS patients have also been tested in animal models. In a recent study, neonatal Swiss mice infected with MR-766-ZIKV and treated with tumor necrosis factor- α (TNF- α) had an improvement in neurological signs. Authors attributed this finding to the inhibition of neuroinflammation, suggesting that this could be an important therapeutic strategy used during early neurodevelopment, which could prevent chronic neurological abnormalities [55].

FDA approved drugs have also been tested against ZIKV. Sofosbuvir (SOF) is a FDA-approved nucleotide analog inhibitor of the Hepatitis C (HCV) RNA-dependent RNA polymerase [56,57]. HCV and ZIKV are both from Flaviviridae family and present homology in the NS5B C-terminal GDD motif, which is highly conserved in the family. Using SOF post-infection (p.i.) in SJL, not only was the viral burden decreased, but also vertical

transmission was prevented in pregnant dams (Table 3) (Figure 1) [58]. In other work, SOF was administered to 5-week-old C57BL/6 mice in drinking water, protecting mice against disease with greater overall survival rates (Table 3) (Figure 1) [59].

Another FDA-approved drug commonly used to combat malarial infection [60] was also tested against ZIKV. A129 and BALB/c mice infected with the GZ01-ZIKV strain were treated with chloroquine (CQ), presenting significant suppression of infection and milk transmission during suckling neonatal mice (Table 3) (Figure 1) [61].

Azithromycin, an antibiotic used against pneumonia, gastrointestinal and sexually transmitted infections, administered in conjunction with another drug against malaria infection, were tested in ICR suckling mice, decreasing viremia and infiltration of monocytes into the CNS, ameliorating clinical signs of infection and providing an increased survival rate (Tables 2 and 3) (Figure 1) [62]. Novobiocin, another antibiotic, and interferon treatments were also tested against ZIKV infection *in vitro* and *in vivo* [63,64]. BALB/c mice immunosuppressed with dexamethasone and treated subcutaneously with novobiocin, had an improvement in survival rate and weight loss, with minimal clinical symptoms observed (Table 3) (Figure 1) [63,64].

Humanized mice models have also been developed and used as models to examine human immune response [65,66]. A recent study using DRAG mice showed that myeloid and B cells are the first targets for ZIKV infection, as well as supporting viral replication. In addition, a designed DNA vaccine based on the PRVABC59 ZIKV strain was protective against viral infection [65]. Another group used BLT humanized mice, which is capable of generating a full repertoire of human immune cells. Infected mice showed chronic viremia of ZIKV, with virus detection on cells like myeloid, B and T cells as well as hematopoietic stem cells and produced neutralizing human antibody responses [66].

2.2. Other rodents: rats, rabbits, guinea pigs, and hamsters

Rodents like rats and rabbits are not commonly used in the investigation of ZIKV pathogenesis, nor drug testing. The first work using rats revealed that they were susceptible to African ZIKV strain infection, but they did not develop clinical signs (Table 4) [67]. In other work, rats efficiently produced antibodies against NS1 from ZIKV, revealing that this protein could be a reliable biological tool for immunological detection [68].

Table 3. Drugs tested against ZIKV in mice models.

Mouse model	ZIKV strain	Drug	Outcomes of treatment (compared to non-treated)	References
A129	HS-2015-BA-01	α -helical peptide (AH)	Increased of survival rates. Reduced viremia. Reduced neuroinflammation.	53
	GZ01	NITD008	Reduced viremia and prevent animal death.	70
		Chloroquine	Reduction of viral particles in blood and milk.	61
AG129	H/PF/2013	7DMA	Delayed clinical signs, reduced viremia and mortality.	45
SCID				
Swiss	MR-766 ZIKV	TNF- α	Reduction in seizures episodes and neuroinflammation. Maintenance of memory and social behavior.	55
SJL	Brazil ZKV2015	Sofosbuvir	Prevented vertical transmission.	58
C57BL/6	Dakar 41,519	Sofosbuvir	Protected against disease and increased survival rates.	59
BALB/c	GZ01	Chloroquine	Suppressed infection.	61
ICR suckling mice model	MR-766	Azithromycin	Decreased viremia and increased survival rate.	62
BALB/C immunosuppressed	PRVABC59	Novobiocin	Increased survival rate.	63

Animal models	Drug	References
Mice	7DMA	[45]
	α -helical peptide (AH)	[53]
	NITD008	[54]
	Sofosbuvir	[58, 59]
	Chloroquine	[61]
	Azithromycin	[62]
Chick embryos	Novobiocin	[63, 64]
	Niclosamide	[75]
Rhesus monkeys	BCX4430	[94]
	Galidesivir	[95]
	25-hydroxycholesterol	[97]
	Neutralizing monoclonal antibodies	[98, 99]

Figure 1. Animal models used for drug testing against Zika virus infection.

Guinea pigs and hamsters are also described as susceptible for ZIKV infection (Table 4) [69,70]. Seroconversion and viral shedding in serum, tears, and saliva of adult guinea-pigs have been reported before [70], though vertical transmission and congenital malformations have not [71]. ZIKV infection in placental and fetal brain tissues was reported only in immunodeficient pregnant hamsters (Table 4) [72]. Interestingly, results of infection seem to be related to ZIKV strains and routes of administration. In hamsters, viremia was prevented when animals were infected subcutaneously with Senegalese or Philippines-ZIKV strains. When hamsters were infected intraperitoneally, viremia was detectable and was higher for the Senegalese-ZIKV strain. Guinea-pigs were solely infected just intraperitoneally, but viremia was not observed (Table 4) [73].

3. Birds used to study ZIKV pathogenesis: chicken embryos

Chicken embryos are also susceptible to ZIKV infection. Importantly, this bird model resembles human fetal development, which turns it into a potential model to study ZIKV infection during embryogenesis, leading to congenital defects (Table 4) [74]. However, higher mortality of these models was accentuated when viral infection occurred at early

development, as well as in humans. As of today, only one drug has been tested in chicken embryos – niclosamide, an FDA-approved antihelminthic drug [75]. In this study, niclosamide was shown to be efficient in the reducing ZIKV-induced microcephaly *in vivo*, an outcome from the injection of infected human neural stem cells (hNSC) into the embryonic brain of chicken embryos (Table 5) (Figure 1) [75].

4. Swines used to study ZIKV infection

Although the evaluation of ZIKV infection in pigs is rare and no anti-ZIKV drugs have been tested in these models yet, two projects have recently shown that fetal pigs are useful to verify the vertical transmission of ZIKV, given that pig models resembles human physiology, immunity, and anatomy. In these studies, *in utero* inoculation in pregnant females allowed the Asian-ZIKV strain to establish persistent placental infection and led to congenital defects in the offspring (Table 4) [76]. In contrast, another study using the same ZIKV strain demonstrated that ZIKV was unable to cross the placental barrier and affect fetuses. However, when the fetuses were intraperitoneally inoculated, ZIKV induced neuronal depletion and microcephaly in all animals (Table 4) [77].

Table 4. Other animal models studied in ZIKV pathogenesis. IC: Intracerebral, IG: Intragastric, IM: Intramuscular, IN: Intranasal, IP: Intraperitoneal, IR: Intrarectal, IV: Intravenous, IVG: Intravaginal, SC: Subcutaneous, O: Oral, hNSCs: human Neural Stem Cells.

Animal model	ZIKV strain	Route of viral administration	Outcome	References
Cotton-rats	African	IC	No signs.	67
Rabbits	African	IC	Neutralizing antibodies produced after infection.	67
Guinea pigs	African	IC	No signs.	67
	PRVABC59	SC	Blood viremia, decreased levels of serum cytokines, lethargy, fever, ruffled fur, hunched back and reduced mobility.	69
Hamsters	GZ01 or FSS13025	SC/IN	Viremia.	70
	AD 41525 (Senegalese) or CPC-0740 (Philippines)	IP	Low percentage of antibody production.	73
	AD 41525 (Senegalese) or CPC-0740 (Philippines)	IP	Mild symptoms, viremia.	73
Chicken embryos	P 6-740 (Malaysian)	SC	Increased morbidity and lethality.	72
	MEX1-44 (Mexican)	SC	Structural malformations in CNS, lethality.	74
	MR-766 (African)	IC	Microcephaly.	75
Piglets	PRVABC59 (Asian)	IU	Viremia in fetal membranes, production of maternal antibodies, small sizes of fetal brains.	76
	PRVABC59 (Asian)	IP in fetuses	Neuronal depletion and microcephaly.	77
Rhesus monkeys	African	IC	Viremia, neutralizing antibodies produced after infection.	67
	African	SC	No signs.	67
	Brazilian	IVG	Viral replication and shedding in the female reproductive tract.	78
	Brazilian	IV	Viremia in urine, plasma and semen for approximately 7 days and relevant activation of lymphoid tissue.	84
	Asian	SC/O	Shedding in urine, blood and saliva.	85
	Asian	SC	Plasma viremia, production of antibodies.	92
	Cambodian	SC	Lesions, gliosis and viremia present in fetal brain tissues.	86
	Brazilian	SC	Fetal demise in cases of vertical transmission.	91
Rhesus and cynomolgous monkeys	AD 41525 (Senegalese)	IVG/IR	Viremia.	79
Cynomolgus monkeys	GZ01	IG/IN	Viral shedding in urine, saliva and tears.	70
Cynomolgus monkeys	FSS13025	SC	Viremia and no signs of viral shedding in urine, saliva and tears.	88
Common marmoset	African	IM	Brief viremia, persistent viral shedding in urine and saliva and intermittent viral load in semen and stool.	91
Pigtail monkeys	Cambodian	SC	Vertical transmission observed, as lesions in fetal brain were verified macroscopically, gliosis and viral RNA in this tissue.	86
Olive baboons	French Polynesian	SC	Conjunctivitis, rash, viremia and systemic immune response in dams. Vertical transmission occurred as seen in impaired formation of fetal cortex, neuroinflammation and presence of ZIKV RNA.	90

5. Nonhuman primates as models for ZIKV infection

Several studies have shown nonhuman primates (NHPs) to be highly permissive to all strains of ZIKV, resembling many aspects of viral pathogenesis in humans and also mimicking different routes of infection (Table 4) [78–81]. Since these animals are closely related to humans, NHPs have been frequently used to test potential therapeutic drugs against ZIKV, as well as vaccine immunization [82,83].

In particular, rhesus monkeys are commonly used as models to study ZIKV pathogenesis, as observed in several studies that proved their susceptibility to different ZIKV strains via divergent routes of infection (Table 4) [67,78,79,81,84–86]. African baboons were also found to be susceptible to ZIKV, reported using ZIKV-positive seroprevalence [87]. Cynomolgus monkeys showed viremia, but no viral shedding in urine, saliva, and tears after subcutaneous inoculation of the Cambodian strain [88]. Interestingly, in the Guinea pig, these biological fluids had viral particles detected when they were infected with the GZ01 strain by intranasal and intragastric inoculation [70]. In addition, other findings suggested that the common marmoset (*Callithrix jacchus*) to be permissive, showing clinical signs and clinical phases of the disease similar to human infection (Table 4) [89]. Furthermore, its small size is advantageous to the testing of drugs and vaccines as less is often needed, which is important, especially when considering that small quantities are only often available during trials. However, it should be noted that only ZIKV pathophysiology has been studied in this animal model thus far.

Although clinical manifestations are not frequently reported in NHPs, vertical transmission had already been described in olive baboons, pregnant pigtail and rhesus monkeys, which were subcutaneously infected with the Cambodian and Brazilian strains of ZIKV, respectively. In pregnant olive baboons, clinical manifestations such as rash and conjunctivitis were observed, as well as viremia and systemic secretion of cytokines. In addition to fetal death, cortical malformation, neuroinflammation, and viral RNA were confirmed in the brain of one fetus [90]. In pregnant pigtail monkeys, infection was evidenced by viral RNA in the brain, along with fetal brain lesions and gliosis [86]. In rhesus monkeys, fetal demise was observed [91] and it has been further shown that the fetus cannot survive in cases of infection by several ZIKV strains during pregnancy (Table 4) [92].

In both instances (whether to treat ZIKV infection or prevent vertical transmission), some drugs have been tested in NHPs. BCX4430, an adenosine analog that inhibits the viral RNA-dependent RNA polymerase [93], had success treating rhesus monkeys previously infected with ZIKV (Table 5) (Figure 1) [94]. Similarly, the same research group presented encouraging results of a second drug, Galidesivir, which also inhibits the viral RNA-dependent RNA polymerase. In addition to BCX4430, intramuscular administration of Galidesivir was well tolerated by rhesus macaques, challenged also by the same Puerto Rico-ZIKV strain, but through diverse routes (subcutaneous and intravaginal). Animals infected subcutaneously and treated with Galidesivir in the first 24 h showed undetectable or very reduced levels of ZIKV RNA in body fluids, like urine, saliva, and cerebrospinal fluid, with no viremia in

Table 5. Other animals used in drug discovery to combat ZIKV infection and pathogenesis.

Animal model	ZIKV strain	Drug	Outcomes of treatment (compared to non-treated)	References
Chick embryos	MR-766	Niclosamide	No microcephaly. Larger eye-opening area. Partially restore: alteration in prosencephalum, ventricular space, reduction of GABAergic neurons and HNSC differentiation. Increase survival rate.	75
Rhesus monkeys	Puerto Rico	BCX4430	Reduced viremia and viral shedding in urine, saliva and cerebrospinal fluid.	94
Rhesus monkeys	Puerto Rico	Galidesivir	Reduced viremia. Less signs of infection.	95
Rhesus monkeys	GZ01/2016	25-hydroxycholesterol	Reduced viremia. Reduced viral shedding in urine. Reduced expression of cytokines: IFN- γ , IL-15, and CXCL9.	96
Rhesus monkeys	KU926309 (Brazilian)	Neutralizing monoclonal antibodies	Blockade of viral replication.	98
Rhesus monkeys	KU926309 (Brazilian)	Neutralizing monoclonal antibodies	Blockade of viremia in serum of pregnant female monkeys but did not prevent vertical transmission.	91
Rhesus monkeys	Brazilian	Neutralizing monoclonal antibodies	Reduction of viremia in plasma.	99

plasma. However, in macaques treated later (up to 72 h.p.i.), viral RNA was detected in plasma, but animals presented delayed onset and/or reduced severity compared with controls. Animals which are intravaginally challenged and treated up to 5 d.p.i. had no plasmatic viremia and presented smaller amounts of viral RNA in the cerebrospinal fluid (Table 5) (Figure 1) [95].

An enzymatic product of cholesterol-25-hydroxylase (CH25H), encoded by an interferon-stimulated gene (ISG), was implicated in the inhibition of viral production [96]. This product, 25-hydroxycholesterol (25HC), was previously tested *in vitro* and *in vivo* against virus infection. Specifically, for ZIKV, intravenous administration of 25HC (1.5 mg/kg/day) could decrease viremia in infected rhesus monkeys (Table 5) (Figure 1) [97]. Lastly, a cocktail of three human neutralizing antibodies (SMZAb1, SMZAb2, and SMZAb5 at 20 mg/kg) was tested in rhesus monkeys, resulting in the protection of these NHPs against increased viremia (Table 5) (Figure 1) [98]. Similarly, this cocktail was administered in infected pregnant rhesus monkeys in order to block vertical transmission of the Brazilian strain. Although the treatment did not eliminate the presence of viral RNA in amniotic fluid, it prevented maternal viremia [91]. Another combination of two human monoclonal antibodies (Z004 and Z021) reduced plasmatic viremia in rhesus monkeys by targeting the envelope domain III (EDIII), even when it contained mutations that could favor viral evasion from immune response [99]. Furthermore, mathematical studies of potentially effective drugs against the Thai ZIKV strain for rhesus monkeys identified Favipiravir [100], a drug already used to treat infections by other RNA viruses [101].

In some geographical locations, NHPs could be co-infected with both ZIKV and another virus. Due to that, non-pregnant rhesus monkeys chronically infected with Simian Immunodeficiency Virus (SIV) were additionally infected with ZIKV, but interestingly, no changes concerning the release of cytokines, clearance, and viremia were observed [102]. Another study involved the study of Dengue virus, another member of the Flaviviridae family, which in theory may confer additional risk in terms of antibody-dependent enhancement (ADE). In fact, in this study, it was proven that ADE may occur *in vitro*. Nonetheless, this was not observed when rhesus monkeys were challenged with ZIKV after Dengue infection [103]. Therefore, monkeys have been proven to be very useful models in drug testing and recent advances in the development of vaccines that could render protection against infection in adults and vertical transmission have also been based on these animals [82,104].

6. Conclusion

Animal models are important tools to study ZIKV. Indeed, SJL mice were fundamental in first demonstrating that ZIKV was able to cross the placental membrane and cause fetus malformations, especially in the brain, in agreement with the phenotype observed in human newborns infected intra-uterus. Although such discovery was fundamental and helped to elucidate some of the mechanisms used by ZIKV to cause its pathogenesis, many questions still remain unanswered. Studies *in vivo* have been using animals like mice, chicken embryos, pigs, rats, rabbits, hamsters, guinea pigs and non-human primates to model ZIKV

disease. Mice are the most explored model, including the wild-types, immunosuppressed and knockout animals. Moreover, different strains of ZIKV and diverse routes of infection have also been tested. It seems that, even though infection usually happens, the signs of infection, as well as severity, are a combination of factors, depending on the viral strain, route of infection and animal model. Furthermore, the viral load used in experimental infection was reported as relevant, with infection signs varying from mild to very severe, even lethality. Interestingly, the age of the animal was less explored, but it seems to be another factor relevant to the severity of infection, with young animals most severely affected.

Connected to animal model establishment, drug development research has been readily evolving with *in vivo* testing an irreplaceable step in. Consequently, adopting feasible animal models is paramount. Again, mice have been the most adopted animal model to test drugs, which might be related to their smaller size, facilities in technical manipulation and physiological similarities to humans. Besides mice, rhesus monkeys have also been extensively used since they are well-known as sentinels of ZIKV infection, thereby susceptible, and are also closely related to human genetics, anatomy, and physiology.

Around 13 drugs have already been tested *in vivo* against ZIKV. Some of them were novel compounds and others are repurposed FDA approved drugs. Regarding the vertical transmission from mother to fetus, Sofosbuvir seems to be promising since it is already FDA-approved, blocks ZIKV replication and was acceptable to pregnant women treated for hepatitis C infection.

7. Expert opinion

The development of drugs against ZIKV is of paramount importance with no approved vaccine yet available. Indeed, ZIKV has caught the world's attention due to the advent of CZS, which presents a special challenge and underlines the importance of bypassing vertical transmission. The establishment of animal models, susceptible to ZIKV infection and vertical transmission, is essential for the advancement of drug discovery and pre-clinical testing.

Regarding CZS, the first step to be pursued should be the development better diagnostic methodologies with high sensitivity and specificity, able to avoid cross-reaction with other Flaviviruses, like Dengue virus, which is epidemic in regions where the mosquito vector (*Aedes* sp.) is endemic, like Brazil and other tropical countries. Usually, when a pregnant woman is infected by ZIKV, the signs of illness are imperceptible, mild or mistaken for Dengue infection, which does not cause congenital infection. In addition, laboratory diagnosis usually provides cross-reaction with Dengue, reverberating false results. Thus, ZIKV infection is usually not perceived or reported. A precise diagnosis is therefore required. That is not to say that effective treatment is not required with there is great need for a treatment that is both effective against the ZIKV but one that is also targeted to avoid vertical transmission. Researchers have been working diligently on very sensible and specific serological tests, able to detect and distinguish between antibodies produced during both the acute and convalescent phase of the disease. These precise diagnostic tests would undoubtedly help to guide

an adequate treatment for the mother, an obvious and very important aspect considering that treatment could be expensive. This is especially relevant for countries like Brazil, where the majority of affected woman were under the poverty line and health programs are sponsored by the government, which necessitates that treatment should not be too expensive in order to cover a larger number of people.

Another very important aspect to be considered is that the ideal scenario for any infectious disease would be the development of an efficient vaccine. Some vaccine candidates against ZIKV infection are under pre-clinical and clinical trials at this moment. Despite this, urgent drug development is still required to block vertical transmission. In this direction, *in vitro* screening could speed up drug development, especially using the right cell target and with an effective and faster readout. In this way, commercialized animal cells were often used as *in vitro* models to test drugs for ZIKV infection. Sofosbuvir, a FDA-approved drug against hepatitis C virus, was first tested in kidney cells of baby hamsters (BHK) and monkeys (Vero) with success [105,106]. In addition to animal cells, human CNS cells revealed to be very useful tools to understand ZIKV pathogenesis in the brain and have also led to direct and effective trials in animal models. Again, sofosbuvir was a good example of teamwork since it was tested *in vivo* directly after obtaining good results using *in vitro* CNS cell models. Besides the improvement of survival rates, sofosbuvir effectively blocked ZIKV vertical transmission in pregnant mice models. Finally, although *in vitro* experiments are useful models to study ZIKV and have the ability to accelerate drug screening, they do not substitute some aspects, like the systemic analysis of a compound during its running, which validates the effects of a drug in the whole organism or, especially relevant for ZIKV effectiveness in blocking vertical transmission.

An important aspect to consider for drug discovery is the cost and time that a drug takes from its early development till its clinical application. In this way, drug repurposing with FDA-approved drugs seems to be a good strategy, reducing the time to clinical trials, which is extremely important, since ZIKV still has the potential to cause other epidemics, even though the number of cases of CZS has decreased significantly. As eluded to before, while some FDA-approved drugs have already been tested in animal models against ZIKV infection, with good results (Tables 3 and 5), this is not a trivial process. Clearly, several steps for clinical trials are necessary while the risk in the number of cases of ZIKV infections emerges in tropical regions every summer at the same time. This important reflection calls for attention and becomes a public health issue, which aims to prevent ZIKV infection in the human population. Additional attention should be shown to deficient children affected by CZS. Although they do not carry the ZIKV anymore, these children are growing, and we do not know how they will progress, especially in terms of neurodevelopment, thus demanding a different strategy of drug development. Furthermore, these patients usually present different degrees of impairment, which should be taken into account in order to develop effective treatments while also looking for drugs that cause minimal side effects.

In summary, the search for feasible animal models for drug testing might be challenging in the case of ZIKV infections, due to the fact that some animals are not naturally susceptible to this virus. In this regard, strategies of *in vitro* and *in vivo* tests should be combined, saving time and research funding. Undeniably, since ZIKV is an infectious disease and infected people produce antibodies against the virus protecting them against another ZIKV infection, a vaccine would solve this issue and we hope that this will be available within the next 5 years.

Acknowledgments

The authors would like to thank Stephanie Hodeib for her help revising this manuscript.

Funding

This work was sponsored by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (18/16748-8; 16/02978-6), the Brazilian NGO 'the tooth fairy project' and in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Finance Code 001; and the CNPq.

Declaration of interest

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

Reviewer Disclosures

Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial or other relationships to disclose.

ORCID

Patricia Cristina Baleeiro Beltrão-Braga <http://orcid.org/0000-0003-0004-1091>

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (+) or of considerable interest (++) to readers.

1. Besnard M, Lastère S, Teissier A, et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance*. 2014;19:20751. Internet. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20751>
2. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 6];29:487–524. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27029595>
3. Chang C, Ortiz K, Ansari A, et al. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];68:1–13. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26925496>
4. Imperato PJ. The convergence of a virus, mosquitoes, and human travel in globalizing the Zika epidemic. *J Community Health*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];41:674–679. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26969497>
5. Wikan N, Smith DR. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect Dis*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];16:

- e119–e126. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27282424>
6. Alvarado MG, Schwartz DA. Zika virus infection in pregnancy, microcephaly, and maternal and fetal health: what we think, what we know, and what we think we know. *Arch Pathol Lab Med*. Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 5];141:26–32. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27636525>
 - **This is an important work that fully described the congenital Zika syndrome**
 7. Cao-Lormeau V-M, Blake A, Mons S, et al. Guillain-Barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];387:1531–1539. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26948433>
 8. Carteaux G, Maquart M, Bedet A, et al. Zika virus associated with Meningoencephalitis. *N Engl J Med*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];374:1595–1596. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26958738>
 9. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. Internet]. 2016;534:1–15. Available from <http://www.nature.com/dofinder/10.1038/nature18296>
 - **This paper first demonstrated vertical transmission of Zika virus using a mice model, leading to a congenital syndrome.**
 10. Dowall SD, Graham VA, Rayner E, et al. A susceptible mouse model for Zika virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. Kading RC, editor. [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];10:e0004658. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004658>
 11. Azar SR, Tesh RB, Vasilakis N, et al. Characterization of a novel murine model to study Zika virus. *Am J Trop Med Hyg*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];94:1362–1369. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27022155>
 12. Aliota MT, Caine EA, Walker EC, et al. Characterization of Lethal Zika virus infection in AG129 mice. *PLoS Negl Trop Dis*. Harris E, editor. [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];10:e0004682. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004682>
 13. Shan C, Xie X, Muruato AE, et al. An infectious cDNA clone of Zika virus to study viral virulence, mosquito transmission, and antiviral inhibitors. *Cell Host Microbe*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];19:891–900. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27198478>
 14. Bradley MP, Nagamine CM. Animal models of Zika virus. *Comp Med*. 2017;67:242–252.
 15. Larocca RA, Abbink P, Peron JPS, et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];536:474–478. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27355570>
 16. de Fatima Vasco Aragao M, van der Linden V, Brainer-Lima AM, et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *BMJ*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];353:1901. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27075009>
 17. Hazin AN, Poretti A, Di Cavalcanti Souza Cruz D, et al. Computed Tomographic findings in Microcephaly associated with Zika virus. *N Engl J Med*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];374:2193–2195. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27050112>
 18. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];47:6–7. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26731034>
 19. Mlakar J, Korva M, Tul N, et al. Zika virus associated with Microcephaly. *N Engl J Med*. Internet]. 2016;374:951–958. Available from <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1600651> <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84959283609&partnerID=40&md5=166538d84731df8bcd942387181bdfa3>
 - **This paper first identified Zika virus in a brain of a microcephalic fetus**
 20. van der Linden V, Pessoa A, Dobyns W, et al. Description of 13 infants born during October 2015–January 2016 with congenital Zika virus infection without microcephaly at birth — Brazil. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];65:1343–1348. Available from <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6547e2.htm>
 - **This paper called the attention to a congenital syndrome caused by Zika virus.**
 21. Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IML, et al. Possible association between Zika virus infection and microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];65:59–62. Available from <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6503e2.htm>
 22. Lizarraga SB, Margossian SP, Harris MH, et al. Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. *Development*. Internet]. 2010 [cited 2018 Dec 5];137:1907–1917. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20460369>
 23. Pulvers JN, Bryk J, Fish JL, et al. Mutations in mouse Aspm (abnormal spindle-like microcephaly associated) cause not only microcephaly but also major defects in the germline. *Proc Natl Acad Sci*. Internet]. 2010 [cited 2018 Dec 5];107:16595–16600. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823249>
 24. Li C, Xu D, Ye Q, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];19:120–126. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27179424>
 25. Wang S, Hong S, Deng Y-Q, et al. Transfer of convalescent serum to pregnant mice prevents Zika virus infection and microcephaly in offspring. *Cell Res*. Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 5];27:158–160. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27922617>
 26. LaMonica BE, Lui JH, Wang X, et al. OSVZ progenitors in the human cortex: an updated perspective on neurodevelopmental disease. *Curr Opin Neurobiol*. Internet]. 2012 [cited 2018 Dec 5];22:747–753. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487088>
 27. Wu K-Y, Zuo G-L, Li X-F, et al. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. *Cell Res*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];26:645–654. Available from <http://www.nature.com/articles/cr201658>
 28. Huang S, Hendriks W, Althage A, et al. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*. (80-). [Internet]. 1993 [cited 2018 Dec 5];259:1742–1745. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8456301>
 29. Muller U, Steinhoff U, Reis L, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*. (80-). [Internet]. 1994 [cited 2018 Dec 5];264:1918–1921. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8009221>
 30. Broek MF, Muller U, Huang S, et al. Immune defence in mice lacking type I and/or Type II interferon receptors. *Immunol. Rev*. Internet]. 1995 [cited 2018 Dec 5];148:5–18. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8825279>
 31. Orozco S, Schmid MA, Parameswaran P, et al. Characterization of a model of lethal dengue virus 2 infection in C57BL/6 mice deficient in the alpha/beta interferon receptor. *J Gen Virol*. Internet]. 2012 [cited 2018 Dec 5];93:2152–2157. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22815273>
 32. Prestwood TR, Morar MM, Zellweger RM, et al. Gamma Interferon (IFN- γ) receptor restricts systemic dengue virus replication and prevents paralysis in IFN- γ -receptor-deficient mice. *J Virol*. Internet]. 2012 [cited 2018 Dec 5];86:12561–12570. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22973027>
 33. Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, et al. A protective role for dengue virus-specific CD8 $^{+}$ T cells. *J Immunol*. Internet]. 2009 [cited 2018 Dec 5];182:4865–4873. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19342665>

34. Shrestha S, Kyle JL, Snider HM, et al. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol*. Internet]. 2004 [cited 2018 Dec 5];78:2701–2710. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14990690>
35. Meier KC, Gardner CL, Khoretonenko MV, et al. A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS Pathog*. Baric RS, editor. [Internet]. 2009 [cited 2018 Dec 5];5:e1000614. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19816561>
36. Lazear HM, Govero J, Smith AM, et al. A mouse model of Zika virus pathogenesis. *Cell Host Microbe*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];19:720–730. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27066744>
37. Miner JJ, Cao B, Govero J, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell*. 2016;165:1081–1091. Internet]. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867416305566>
38. Aoki K, Shimada S, Simantini D, et al. Type-I interferon response affects an inoculation dose-independent mortality in mice following Japanese encephalitis virus infection. *Virol J*. Internet]. 2014 [cited 2018 Dec 5];11:105. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903089>
39. Berezky S, Lindegren G, Karlberg H, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice. *J Gen Virol*. Internet]. 2010 [cited 2018 Dec 5];91:1473–1477. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164263>
40. Dowall SD, Findlay-Wilson S, Rayner E, et al. Hazara virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice and may act as a surrogate for infection with the human-pathogenic Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol*. Internet]. 2012 [cited 2018 Dec 5];93:560–564. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22090213>
41. Partidos CD, Paykel J, Weger J, et al. Cross-protective immunity against o'nyong-nyong virus afforded by a novel recombinant chikungunya vaccine. *Vaccine*. Internet]. 2012 [cited 2018 Dec 5];30:4638–4643. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22583812>
42. Seymour RL, Rossi SL, Weaver SC, et al. The role of innate versus adaptive immune responses in a mouse model of O'Nyong-Nyong virus infection. *Am J Trop Med Hyg*. Internet]. 2013 [cited 2018 Dec 5];88:1170–1179. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23568285>
43. Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. Internet]. 2011 [cited 2018 Dec 5];17:880–882. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21529401>
44. Musso D, Roche C, Robin E, et al. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis*. Internet]. 2015 [cited 2018 Dec 5];21:359–361. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25625872>
45. Zmurko J, Marques RE, Schols D, et al. The viral polymerase inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine is a potent inhibitor of in vitro Zika virus replication and delays disease progression in a robust mouse infection model. *PLoS Negl Trop Dis*. Powers AM, editor. [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];10:e0004695. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004695>
46. Govero J, Esakky P, Scheaffer SM, et al. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];540:438–442. Available from <http://www.nature.com/articles/nature20556>
47. Ma W, Li S, Ma S, et al. Zika virus causes testis damage and leads to male infertility in mice. *Cell*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];167:1511–1524.e10. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27884405>
48. Tang WW, Young MP, Mamidi A, et al. A mouse model of Zika virus sexual transmission and vaginal viral replication. *Cell Rep*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];17:3091–3098. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28009279>
49. Yockey LJ, Varela L, Rakib T, et al. Vaginal exposure to Zika virus during pregnancy leads to fetal brain infection. *Cell*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];166:1247–1256.e4. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27565347>
50. Ventura CV, Maia M, Travassos SB, et al. Risk factors associated with the ophthalmoscopic findings identified in infants with presumed Zika virus congenital infection. *JAMA Ophthalmol*. 2016;134:912. Internet].
51. de Paula Freitas B, de Oliveira Dias JR, Prazeres J, et al. Ocular findings in infants with microcephaly associated with presumed Zika virus congenital infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol*. 2016;134:529. Internet].
52. Miner JJ, Sene A, Richner JM, et al. Zika virus infection in mice causes panuveitis with shedding of virus in tears. *Cell Rep*. 2016;16:3208–3218. Internet]. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124716311755>
53. Jackman JA, Costa VV, Park S, et al. Therapeutic treatment of Zika virus infection using a brain-penetrating antiviral peptide. *Nat Mater*. Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 6];17:971–977. Available from <http://www.nature.com/articles/s41563-018-0194-2>
54. Deng Y-Q, Zhang -N-N, Li C-F, et al. Adenosine analog NITD008 is a potent inhibitor of Zika virus. *Open Forum Infect Dis*. 2016;3: ofw175. Internet]. Available from <https://academic.oup.com/ofid/article-lookup/doi/10.1093/ofid/ofw175>
55. 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:ear2749. Internet]. Available from <http://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.ear2749>
56. Murakami E, Tolstykh T, Bao H, et al. Mechanism of activation of PSI-7851 and its diastereoisomer PSI-7977. *J Biol Chem*. 2010;285:34337–34347. Internet]. Available from <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M110.161802>
57. Sofia MJ, Bao D, Chang W, et al. Discovery of a β -D-2'-Deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine Nucleotide Prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *J Med Chem*. 2010;53:7202–7218. Internet]. Available from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm100863x>
58. Mesci P, Macia A, Moore SM, et al. Blocking Zika virus vertical transmission. *Sci Rep*. Internet]. 2018;8:1218. Available from <http://www.nature.com/articles/s41598-018-19526-4>
- .. This paper first demonstrated a drug that blocks vertical transmission of Zika.
59. Bullard-Feibelman KM, Govero J, Zhu Z, et al. The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. *Antiviral Res*. Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 5];137:134–140. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27902933>
60. Browning DJ. 2014. Hydroxychloroquine and Chloroquine Retinopathy. [Internet]. Hydroxychloroquine Chloroquine Retin. New York, NY: Springer New York. Available from <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0597-3>
61. Li C, Zhu X, Ji X, et al. Chloroquine, a FDA-approved drug, prevents Zika virus infection and its associated congenital microcephaly in mice. *EBioMedicine*. 2017;24:189–194. Internet].
62. Wu Y-H, Tseng C-K, Lin C-K, et al. ICR suckling mouse model of Zika virus infection for disease modeling and drug validation. *PLoS Negl Trop Dis*. Lacerda MV, editor. [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 8];12:e0006848. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30356305>
63. Yuan S, Chan JF-W, Den-Haan H, et al. Structure-based discovery of clinically approved drugs as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors that potently inhibit Zika virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res*. Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 5];145:33–43. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354217301754>
64. Chan JF-W, Zhang AJ, Chan CC-S, et al. Zika virus infection in dexamethasone-immunosuppressed mice demonstrating disseminated infection with multi-organ involvement including orchitis effectively treated by recombinant type I interferons.

- EBioMedicine. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 5];14:112–122. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27884655>
65. Yi G, Xu X, Abraham S, et al. A DNA vaccine protects human immune cells against Zika virus infection in humanized mice. *EBioMedicine*. 2017;25:87–94. Internet].
 66. Schmitt K, Charlins P, Veselinovic M, et al. Zika viral infection and neutralizing human antibody response in a BLT humanized mouse model. *Virology*. 2018;515:235–242. Internet]. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682217304397>
 67. Dick GWA. Zika virus (II). pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952;46:521–534.
 - This was the first paper describing Zika virus pathogenicity.
 68. Viranackien W, Ndebo A, Bos S, et al. Recombinant Zika NS1 protein secreted from vero cells is efficient for inducing production of immune serum directed against NS1 dimer. *Int J Mol Sci*. 2017;19:38. Internet]. Available from <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/38>
 69. Kumar M, Krause KK, Azouz F, et al. A guinea pig model of Zika virus infection. *Virology*. 2017;14:75. Internet]. Available from <http://virology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-017-0750-4>
 70. Deng Y-Q, Zhang -N-N, Li X-F, et al. Intranasal infection and contact transmission of Zika virus in guinea pigs. *Nat Commun*. Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 6];8:1648. Available from <http://www.nature.com/articles/s41467-017-01923-4>
 71. Bierle CJ, Fernández-Alarcón C, Hernandez-Alvarado N, et al. Assessing Zika virus replication and the development of Zika-specific antibodies after a mid-gestation viral challenge in guinea pigs. *PLoS One*. Roques P, editor. [Internet]. 2017;12:e0187720. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0187720>.
 72. Siddharthan V, Van Wettene AJ, Li R, et al. Zika virus infection of adult and fetal STAT2 knock-out hamsters. *Virology*. 2017;507:89–95. Internet]. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682217301216>
 73. Bavari S, Schellhase CW, Nasar F, et al. Zika virus infection in syrian golden hamsters and strain 13 guinea pigs. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98:864–867. Internet]. Available from <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.17-0686>
 74. Goodfellow FT, Tesla B, Simchick G, et al. Zika virus induced mortality and microcephaly in chicken embryos. *Stem Cells Dev*. 2016;25:1691–1697. Internet]. Available from <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2016.0231>
 75. Cairns DM, Boorgu DSSK, Levin M, et al. Niclosamide rescues microcephaly in a humanized *in vivo* model of Zika infection using human induced neural stem cells. *Biol Open*. 2018;7:bio031807. Internet]. Available from <http://bio.biologists.org/lookup/doi/10.1242/bio.031807>
 76. Darbellay J, Cox B, Lai K, et al. Zika virus causes persistent infection in porcine conceptuses and may impair health in offspring. *EBioMedicine*. Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 5];25:73–86. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396417303754>
 77. Wichgers Schreur PJ, van Keulen L, Anjema D, et al. Microencephaly in fetal piglets following in utero inoculation of Zika virus. *Emerg Microbes Infect*. Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 6];7:42. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29593256>
 78. Carroll T, Lo M, Lanteri M, et al. Zika virus preferentially replicates in the female reproductive tract after vaginal inoculation of rhesus macaques. *PLoS Pathog*. 2017;13:1–23.
 79. Haddow AD, Nalca A, Rossi FD, et al. High infection rates for adult macaques after intravaginal or intrarectal inoculation with Zika virus. *Emerg Infect Dis*. Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 5];23:1274–1281. Available from http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/8/17-0036_article.htm
 80. Osuna CE, Whitney JB. Nonhuman primate models of Zika virus infection, immunity, and therapeutic development. *J Infect Dis*. Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 5];216:S928–S934. Available from https://academic.oup.com/jid/article/216/suppl_10/S928/4753687
 81. Dudley DM, Aliota MT, Mohr EL, et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nat Commun*. 2016;7:1–9.
 82. Abbink P, Larocca RA, De La Barrera RA, et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science*. (80-). [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 6];353:1129–1132. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27492477>
 83. Dowd KA, Ko S-Y, Morabito KM, et al. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. *Science*. Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 6];354:237–240. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27708058>
 84. Silveira ELV, Rogers KA, Gumber S, et al. Immune cell dynamics in rhesus macaques infected with a Brazilian strain of Zika virus. *J Immunol*. 2017;199:1003–1011. Internet]. Available from <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1700256>
 85. Newman CM, Dudley DM, Aliota MT, et al. Oropharyngeal mucosal transmission of Zika virus in rhesus macaques. *Nat Commun*. Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 5];8:169. Available from <http://www.nature.com/articles/s41467-017-00246-8>
 86. Adams Waldorf KM, Stencel-Baerenwald JE, Kapur RP, et al. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. *Nat Med*. 2016;22:1256–1259. Internet]. Available from <http://www.nature.com/articles/nm.4193>
 87. Buechler CR, Bailey AL, Weiler AM, et al. Seroprevalence of Zika virus in wild African green monkeys and baboons. *mSphere*. Schoggins J, editor. [Internet]. 2017;2:1–7. Available from <http://msphere.asm.org/lookup/doi/10.1128/mSphere.00392-16>.
 88. Azar SR, Rossi SL, Haller SH, et al. ZIKV demonstrates minimal pathologic effects and mosquito infectivity in viremic cynomolgus macaques. *Viruses*. 2018;10:1–20.
 89. Chiu CY, Sánchez-San Martín C, Bouquet J, et al. Experimental Zika virus inoculation in a new world monkey model reproduces key features of the human infection. *Sci Rep*. Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 6];7:17126. Available from <http://www.nature.com/articles/s41598-017-17067-w>
 90. Gurung S, Reuter N, Preno A, et al. Zika virus infection at mid-gestation results in fetal cerebral cortical injury and fetal death in the olive baboon. *PLoS Pathog*. Coyne CB, editor. [Internet]. 2019;15:e1007507. Available from <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1007507>
 91. Magnani DM, Rogers TF, Maness NJ, et al. Fetal demise and failed antibody therapy during Zika virus infection of pregnant macaques. *Nat Commun*. 2018;9:1–8. Internet].
 92. Dudley DM, Van Rompay KK, Coffey LL, et al. Miscarriage and stillbirth following maternal Zika virus infection in nonhuman primates. *Nat Med*. 2018;24:1104–1107. Internet]. Available from <http://www.nature.com/articles/s41591-018-0088-5>
 93. Warren TK, Wells J, Panchal RG, et al. Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. *Nature*. Internet]. 2014 [cited 2018 Dec 5];508:402–405. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24590073>
 94. Lim S-Y, Osuna C, Taylor R, et al. BCX4430, a broad-spectrum adenosine analog direct-acting antiviral drug, abrogates viremia in rhesus macaques challenged with Zika virus. *Open Forum Infect Dis*. 2016;3:LB-5-LB-5. Internet].
 95. Lim S-Y, Osuna C, Lakritz J, et al. Galidesivir, a direct-acting antiviral drug, abrogates viremia in rhesus macaques challenged with Zika virus. *Open Forum Infect Dis*. Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 5];4:S55–S55. Available from http://academic.oup.com/ofid/article/4/suppl_1/S55/4294108/Galidesivir-a-Direct-Acting-Antiviral-Drug
 96. Liu S-Y, Aliyari R, Chikere K, et al. Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-Hydroxycholesterol. *Immunity*. 2013;38:92–105. Internet]. Available from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761312005109>
 97. Li C, Deng YQ, Wang S, et al. 25-Hydroxycholesterol protects host against Zika virus infection and its associated microcephaly in a mouse model. *Immunity*. 2017;46:446–456. Internet].
 98. Magnani DM, Rogers TF, Beutler N, et al. Neutralizing human monoclonal antibodies prevent Zika virus infection in macaques. *Sci Transl Med*. 2017;9:1–8.
 99. Keeffe JR, Van Rompay KKA, Olsen PC, et al. A combination of two human monoclonal antibodies prevents Zika virus escape

- mutations in non-human primates. *Cell Rep.* 2018;25:1385–1394.e7. Internet].
100. Best K, Guedj J, Madelain V, et al. Zika plasma viral dynamics in nonhuman primates provides insights into early infection and antiviral strategies. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114:8847–8852. Internet]. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1704011114>
 101. Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, et al. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* 2013;100:446–454. Internet]. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354213002635>
 102. Bidokhti MRM, Dutta D, Madduri LSV, et al. SIV/SHIV-Zika co-infection does not alter disease pathogenesis in adult non-pregnant rhesus macaque model. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:e0006811.
 103. 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;8:15674.
 104. Aliota MT, Dudley DM, Newman CM, et al. Heterologous protection against Asian Zika virus challenge in rhesus macaques. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:1–22.
 105. Barrows NJ, Campos RK, Powell ST, et al. A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. *Cell Host Microbe.* Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 6];20:259–270. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27476412>
 106. Sacramento CQ, de Melo GR, de Freitas CS, et al. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. *Sci Rep.* 2017;7:40920. Internet]. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep40920>